

# **Desenvolvimento de rebuçados com incorporação de microalgas**

**João Pedro Sequeira Germano**

Dissertação para a obtenção do Grau de Mestre em  
**Engenharia Alimentar**

Orientador: Doutora Isabel Maria Nunes de Sousa

Coorientador: Doutora Anabela Cristina da Silva Naret Moreira Raymundo

## **Júri:**

Presidente: Doutora Margarida Gomes Moldão Martins, Professora Auxiliar com agregação do Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa

Vogais: Doutora Isabel Maria Nunes de Sousa, Professora Associada com agregação do Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa

Doutor Miguel Pedro de Freitas Barbosa Mourato, Professor Auxiliar do Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa

## **AGRADECIMENTOS**

Não obstante o carácter individual que caracteriza a dissertação, é necessário salientar a contribuição de pessoas que ajudaram à concretização desta importante etapa académica. Assim, e porque para bom entendedor meia palavra basta, deixo aqui os meus breves mas sinceros agradecimentos:

Às Professoras Isabel de Sousa, minha orientadora, e Anabela Raymundo, co-orientadora, por me colocarem o desafio de realizar esta dissertação, pela vasta competência científica patente em ambas, pelo apoio e disponibilidade demonstrados e ainda pelas críticas e sugestões feitas durante toda a orientação.

À LUSITECA, com especial destaque para a Engenheira Joana Santana e todos os funcionários com participação activa neste projecto, pelo apoio e gentileza demonstrados.

À Allma, mais concretamente à Dra. Sofia Mendonça, pela colaboração e disponibilização pronta da microalga.

Aos colegas e amigos que, de forma directa ou indirecta, estiveram presentes no meu dia-a-dia e contribuíram positivamente para o concretizar da dissertação.

Por fim, mas com maior ênfase, aos meus pais e irmã. Foram eles que tornaram esta etapa numa realidade e contribuíram de forma decisiva para a pessoa que sou hoje. A eles um muito obrigado!

## RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo principal desenvolver um produto de confeitaria contendo duas microalgas - *Chlorella vulgaris* e *Spirulina platensis* – em diversas concentrações. Subjacente a este objetivo principal pretendeu-se estudar o comportamento do produto desenvolvido em quatro condições de conservação diferentes. Para tal, avaliaram-se os parâmetros de cor, humidade, atividade da água ( $a_w$ ), atividade antioxidante e análise sensorial ao longo das condições de conservação referidas. Por fim, pretendeu-se comparar os produtos desenvolvidos com as duas microalgas utilizadas.

Em relação ao parâmetro da cor, verificou-se que existe um incremento de coloração verde que acompanha as concentrações crescentes de microalga. No entanto, este incremento de cor entre os produtos com diferentes concentrações de microalga, apenas se torna perceptível sensorialmente com adições de microalga iguais ou superiores a 0,10%.

A humidade e o  $a_w$  revelaram ter um comportamento bastante semelhante entre os produtos controlo e com microalgas. Os produtos com microalga seguem o perfil higroscópico dos produtos controlo e apresentam boa estabilidade, tal como acontece com o  $a_w$ .

Os produtos com maior atividade antioxidante foram, no geral, os que contêm 0,10% de microalga.

A análise sensorial revelou que os produtos com melhores classificações foram aqueles contendo essência de meloa.

**Palavras-chave:** produto de confeitaria, microalgas, essências, *Chlorella vulgaris*, *Spirulina platensis*, condições de conservação

## ABSTRACT

The main purpose of this work was to develop a confectionery product containing two microalgae – *Chlorella vulgaris* and *Spirulina platensis* – at several concentrations. Underlying this main purpose was intended to study the behavior of the product developed in four different storage conditions. To this end, were assessed of color, moisture, water activity ( $a_w$ ), antioxidant activity and sensory analysis along the storage conditions. Finally, it was intended to compare the products developed with microalgae.

Regarding the color parameter, it was found that there is na increase in green staining accompanying the increasing concentrations of microalgae. However, this increase in color between the products with different concentrations of microalgae, only becomes noticeable sensorially with additions of microalgae equal or higher than 0.10%.

The moisture and  $a_w$  were found to have a very similar behavior between the control product and those containing microalgae. The products with microalgae follow the hygroscopic profile of control products and exhibit good stability, as does the  $a_w$ .

Products with higher antioxidant activity were, in general, those containing 0.10% of microalgae.

Sensory analysis revealed that products with better ratings were those containing essence of melon.

**Keywords:** confectionery product, microalgae, essences, *Chlorella vulgaris*, *Spirulina platensis*, storage conditions

## EXTENDED ABSTRACT

The development of new products is an activity crucial for the sustainability of most companies. The continuous renewal of its products is a widespread policy of the business context. The product development is closely linked to the needs and consumer trends of most consumers, which consequently implies the need for quick responses to changes in food consumer market industries.

The present work is a response to a request from LUSITECA company that intends to expand its product portfolio. It is a dynamic company that recognizes the value of innovation and established a protocol with Instituto Superior de Agronomia in the development of this work.

The main purpose of this work was to develop a confectionery product containing two microalgae – *Chlorella vulgaris* and *Spirulina platensis* – in growing concentrations (w/w) (0.00%; 0.025%; 0.05%; 0.10%; 0.15% and 0.20%). Underlying this main purpose was intended to study the behavior of the product developed in four different storage conditions: room temperature in the dark for 10 weeks (A); room temperature under artificial light source for 10 weeks (B); incubator at 55 ° C for 7 days (C); incubator at 30 ° C for 21 days (D). Throughout the storage conditions were evaluated parameters as color, moisture, water activity ( $a_w$ ), antioxidant activity and sensory analysis. Finally, we sought to compare the products developed with both microalgae used. Finally, it was intended to compare the products developed with microalgae.

The results indicated that the incorporation of microalgae *Chlorella vulgaris* and *Spirulina platensis* affected differently the various properties studied in the developed products. Regarding the color parameter, it was found that there is an increase in green staining accompanying the increasing concentrations of microalgae. However, this increase in color between the products with different concentrations of microalgae, only becomes noticeable sensorially with additions of microalgae equal or higher than 0.10%.

The moisture and  $a_w$  were found to have a very similar behavior between the control product and those containing microalgae. The products with microalgae follow the hygroscopic profile of control products and exhibit good stability, as does the  $a_w$ .

Products with higher antioxidant activity were, in general, those containing 0.10% of microalgae.

The different storage conditions showed to have no influence on color and antioxidant activity parameters. On the other hand, the products have shown different behaviors of  $a_w$  and moisture in different storage conditions.

Sensory analysis revealed that products with better ratings were those containing essence of melon, followed by mango.

Finally, it should be noted that we are facing a product whose formulation contains a source of bioactive compounds (as are the microalgae) and thus suggests the creation of a new brand covering these products. This should be done due to the innovative nature of the products and the consequent increase in value, which should be transmitted to the consumer.

# ÍNDICE GERAL

<b>AGRADECIMENTOS</b> .....	i
<b>RESUMO</b> .....	ii
<b>ABSTRACT</b> .....	iii
<b>EXTENDED ABSTRACT</b> .....	iv
<b>ÍNDICE GERAL</b> .....	vi
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	viii
<b>ÍNDICE DE TABELAS</b> .....	xii
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	xiv

<b>INTRODUÇÃO E OBJETIVOS</b> .....	1
<b>1. CONSIDERAÇÕES TEÓRICAS</b> .....	3
1.1. Indústria Confeiteira: O caso dos rebuçados .....	3
1.2. Confeitaria funcional .....	4
1.2.1. Desenvolvimento e fabrico de produtos .....	4
1.2.2. Desenvolvimento de uma formulação de produto .....	5
1.2.3. Limitações do processamento .....	6
1.2.4. Definição do conceito do produto .....	6
1.2.5. Marketing da confeitaria funcional.....	7
1.2.6. Aspectos de retalho .....	7
1.2.7. Alegações acerca do produto.....	8
1.3. Microalgas .....	9
1.3.1. Características.....	9
1.3.2. Classificação.....	9
1.3.3. Composição nutricional das microalgas .....	10
1.3.5. <i>Chlorella vulgaris</i> .....	14
1.3.6. <i>Spirulina platensis</i> .....	18
1.3.7. Aplicações comerciais .....	20

1.3.8. Regulamentação.....	21
<b>2. MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>23</b>
2.1. Materiais .....	23
2.2. Métodos .....	23
2.2.1. Preparação do produto de confeitaria .....	23
2.2.2. Condições de conservação .....	25
2.2.3. Determinação instrumental da cor .....	25
2.2.4. Caracterização físico-química .....	27
2.2.4.1. Preparação das amostras .....	27
2.2.4.2. Determinação do teor de humidade .....	27
2.2.4.3. Determinação da atividade da água .....	27
2.2.4.4. Determinação da atividade antioxidante.....	27
2.2.5. Análise sensorial .....	29
2.2.6. Análise estatística .....	29
<b>3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>30</b>
3.1. Avaliação da cor.....	30
3.2. Determinação do teor de humidade.....	53
3.4. Determinação da atividade da água.....	57
3.4. Determinação da atividade antioxidante .....	61
3.5. Análise sensorial .....	64
<b>4. CONCLUSÕES .....</b>	<b>66</b>
<b>5. TRABALHOS FUTUROS .....</b>	<b>67</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>67</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>74</b>



## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Observação microscópica da microalga <i>Chlorella vulgaris</i> .....	14
<b>Figura 2.</b> Observação microscópica da microalga <i>Spirulina platensis</i> .....	18
<b>Figura 3.</b> Produção (toneladas) mundial de biomassa de <i>Spirulina</i> entre os anos de 1975 e 1999 .....	20
<b>Figura 4.</b> Diagrama de produção do produto de confeitaria.....	24
<b>Figura 5.</b> Formas reduzidas (à direita) e livres (à esquerda) do picrilhidrazil (DPPH) .	28
<b>Figura 6.</b> Produtos obtidos a partir da essência de spearmint e a microalga <i>Chlorella vulgaris</i> .....	30
<b>Figura 7.</b> Parâmetros cromáticos ( $L$ , $a$ e $b$ ) dos rebuçados com essência de spearmint, contendo diferentes concentrações de biomassa de <i>Chlorella vulgaris</i> , no início e fim das condições de conservação A (Escuro; 10 semanas) e B (Luz constante; 10 semanas) .....	31
<b>Figura 8.</b> Parâmetros cromáticos ( $L$ , $a$ e $b$ ) dos rebuçados com essência de spearmint, contendo diferentes concentrações de biomassa de <i>Chlorella vulgaris</i> , no início e fim das condições de conservação C (Estufa a 55°C; 7 dias) e D (Estufa a 30°C; 21 dias) ..	32
<b>Figura 9.</b> Produtos obtidos a partir da essência de meloa e a microalga <i>Chlorella vulgaris</i> .....	33
<b>Figura 10.</b> Produtos obtidos a partir da essência de manga e a microalga <i>Chlorella vulgaris</i> .....	34
<b>Figura 11.</b> Parâmetros cromáticos ( $L$ , $a$ e $b$ ) dos rebuçados com essência de meloa, contendo diferentes concentrações de biomassa de <i>Chlorella vulgaris</i> , no início e fim das condições de conservação A (Escuro; 10 semanas) e B (Luz constante; 10 semanas) .....	35

**Figura 12.** Parâmetros cromáticos (*L*, *a* e *b*) dos rebuçados com essência de meloa, contendo diferentes concentrações de biomassa de *Chlorella vulgaris*, no início e fim das condições de conservação C (Estufa a 55°C; 7 dias) e D (Estufa a 30°C; 21 dias) .. 36

**Figura 13.** Parâmetros cromáticos (*L*, *a* e *b*) dos rebuçados com essência de manga, contendo diferentes concentrações de biomassa de *Chlorella vulgaris*, no início e fim das condições de conservação A (Escuro; 10 semanas) e B (Luz constante; 10 semanas) ..... 37

**Figura 14.** Parâmetros cromáticos (*L*, *a* e *b*) dos rebuçados com essência de manga, contendo diferentes concentrações de biomassa de *Chlorella vulgaris*, no início e fim das condições de conservação C (Estufa a 55°C; 7 dias) e D (Estufa a 30°C; 21 dias) .. 38

**Figura 15.** Produtos obtidos a partir da essência de spearmint e a microalga *Spirulina platensis*..... 39

**Figura 16.** Parâmetros cromáticos (*L*, *a* e *b*) dos rebuçados com essência de spearmint, contendo diferentes concentrações de biomassa de *Spirulina platensis*, no início e fim das condições de conservação A (Escuro; 10 semanas) e B (Luz constante; 10 semanas) ..... 40

**Figura 17.** Parâmetros cromáticos (*L*, *a* e *b*) dos rebuçados com essência de spearmint, contendo diferentes concentrações de biomassa de *Spirulina platensis*, no início e fim das condições de conservação C (Estufa a 55°C; 7 dias) e D (Estufa a 30°C; 21 dias) .. 41

**Figura 18.** Produtos obtidos a partir da essência de limão e a microalga *Spirulina platensis*..... 42

**Figura 19.** Parâmetros cromáticos (*L*, *a* e *b*) dos rebuçados com essência de limão, contendo diferentes concentrações de biomassa de *Spirulina platensis*, no início e fim das condições de conservação A (Escuro; 10 semanas) e B (Luz constante; 10 semanas) ..... 43

**Figura 20.** Parâmetros cromáticos (*L*, *a* e *b*) dos rebuçados com essência de limão, contendo diferentes concentrações de biomassa de *Spirulina platensis*, no início e fim das condições de conservação C (Estufa a 55°C; 7 dias) e D (Estufa a 30°C; 21 dias) .. 44

<b>Figura 21.</b> Produtos obtidos a partir da essência de limão e a microalga <i>Chlorella vulgaris</i> .....	45
<b>Figura 22.</b> Parâmetros cromáticos ( <i>L</i> , <i>a</i> e <i>b</i> ) dos rebuçados com essência de limão, contendo diferentes concentrações de biomassa de <i>Chlorella vulgaris</i> , no início e fim das condições de conservação A (Escuro; 10 semanas) e B (Luz constante; 10 semanas) .....	46
<b>Figura 23.</b> Parâmetros cromáticos ( <i>L</i> , <i>a</i> e <i>b</i> ) dos rebuçados com essência de limão, contendo diferentes concentrações de biomassa de <i>Chlorella vulgaris</i> , no início e fim das condições de conservação C (Estufa a 55°C; 7 dias) e D (Estufa a 30°C; 21 dias) ..	47
<b>Figura 24.</b> Teores de humidade dos rebuçados elaborados com essências de spearmint, meloa e manga (contendo <i>Chlorella vulgaris</i> ), na fase inicial e final de cada condição de conservação .....	54
<b>Figura 25.</b> Teores de humidade dos rebuçados elaborados com essências de spearmint (contendo <i>Chlorella vulgaris</i> ) e limão (contendo <i>Chlorella vulgaris</i> e <i>Spirulina platensis</i> ), na fase inicial e final de cada condição de conservação .....	55
<b>Figura 26.</b> Atividade da água dos rebuçados elaborados com essências de spearmint, meloa e manga (contendo <i>Chlorella vulgaris</i> ), na fase inicial e final de cada condição de conservação .....	58
<b>Figura 27.</b> Atividade da água dos rebuçados elaborados com essências de spearmint (contendo <i>Chlorella vulgaris</i> ) e limão (contendo <i>Chlorella vulgaris</i> e <i>Spirulina platensis</i> ), na fase inicial e final de cada condição de conservação .....	59
<b>Figura 28.</b> RSA ( <i>Radical Scavenging Activity</i> ) dos rebuçados elaborados com essência de limão contendo <i>Chlorella vulgaris</i> , na fase inicial e final de cada condição de conservação .....	62
<b>Figura 29.</b> RSA ( <i>Radical Scavenging Activity</i> ) dos rebuçados elaborados com essência de limão contendo <i>Spirulina platensis</i> , na fase inicial e final de cada condição de conservação .....	63

<b>Figura 30.</b> Resultados da análise sensorial efetuada aos diferentes rebuçados contendo diferentes essências e microalgas. ....	65
--	----

## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Composição geral de diferentes fontes alimentares humanas e microalgas (% de massa seca) .....	10
<b>Tabela 2.</b> Perfil de aminoácidos de diferentes microalgas comparados com fontes de proteína convencionais e a referência padrão (g/100 g de proteína) da WHO/FAO (1973) .....	11
<b>Tabela 3.</b> Ácidos Gordos Polinsaturados particularmente interessantes.....	12
<b>Tabela 4.</b> Classificação taxonómica da microalga <i>Chlorella vulgaris</i> .....	14
<b>Tabela 5.</b> Composição química da matéria seca de <i>Chlorella vulgaris</i> .....	16
<b>Tabela 6.</b> Conteúdo potencial de pigmentos em <i>Chlorella vulgaris</i> sob diferentes condições de crescimento.....	17
<b>Tabela 7.</b> Classificação taxonómica da microalga <i>Spirulina platensis</i> .....	18
<b>Tabela 8.</b> Composição química da matéria seca de <i>Spirulina platensis</i> .....	19
<b>Tabela 9.</b> Estado actual da produção de microalgas .....	21
<b>Tabela 10.</b> Microalgas relevantes para aplicações em alimentos/suplementos e os seus aspectos de segurança. GRAS, Generally Recognizes as Safe, ST, Sem Toxina. ....	22
<b>Tabela 11.</b> Características gerais da lâmpada utilizada como fonte luminosa artificial na condição de conservação B (Luz constante; 10 semanas).....	25
<b>Tabela 12.</b> Mapa de análises efetuadas relativamente aos parâmetros cromáticos durante a condição de conservação C (Estufa a 55°C; 7 dias).....	26
<b>Tabela 13.</b> Mapa de análises efetuadas relativamente aos parâmetros cromáticos durante a condição de conservação D (Estufa a 30°C; 21 dias) .....	26

<b>Tabela 14.</b> Diferenças de cor ( $\Delta E$ ) obtidas dos produtos elaborados contendo as várias essências e as diferentes concentrações (m/m) de microalgas na condição de conservação A (entre a semana 0 e semana 10) .....	49
<b>Tabela 15.</b> Diferenças de cor ( $\Delta E$ ) obtidas dos produtos elaborados contendo as várias essências e as diferentes concentrações (m/m) de microalgas na condição de conservação B (entre a semana 0 e semana 10).....	50
<b>Tabela 16.</b> Diferenças de cor ( $\Delta E$ ) obtidas dos produtos elaborados contendo as várias essências e as diferentes concentrações (m/m) de microalgas na condição de conservação C (entre o dia 0 e dia 7) .....	50
<b>Tabela 17.</b> Diferenças de cor ( $\Delta E$ ) obtidas dos produtos elaborados contendo as várias essências e as diferentes concentrações (m/m) de microalgas na condição de conservação D (entre o dia 0 e dia 21).....	51
<b>Tabela 18.</b> Comparação dos valores de $\Delta E$ dos produtos com diferentes concentrações (m/m) de microalga incorporada nas diferentes essências, na condição de conservação D (dia 0) .....	52
<b>Tabela 19.</b> Comparação dos valores do teor de humidade entre os produtos elaborados com diferentes essências e microalgas no início e fim de cada condição de conservação .....	56
<b>Tabela 20.</b> Comparação do $a_w$ entre os produtos elaborados com diferentes essências e microalgas no início e fim de cada condição de conservação .....	60
<b>Tabela 21.</b> Comparação estatística do RSA entre o início e fim de cada condição de conservação entre os rebuçados elaborados com essência de limão e as diferentes microalgas .....	61

## LISTA DE ABREVIATURAS

A lista que se segue contém determinadas palavras em inglês devido ao seu reconhecimento unânime no contexto científico.

$a_w$  – Atividade da água

Cv – *Chlorella vulgaris*

DPPH – 1,1-difenil-2-picrilhidrazil

GRAS – Generally Recognized as Safe

JND – Just Noticeable Difference

NT – no toxins known

PUFA – Polyunsaturated Fatty Acids

QPS - Qualified Presumption of Safety

RSA – Radical Scavenging Activity

Sp – *Spirulina platensis*

## **INTRODUÇÃO E OBJETIVOS**

O desenvolvimento de novos produtos é uma atividade de crucial importância para a sustentabilidade da maioria das empresas. A renovação continua dos seus produtos é uma política generalizada do âmbito empresarial (Dimancescu e Dwenger 1997 e Athayde 1999). O desenvolvimento de produtos está em estreita relação com as necessidades e tendências ou modas de consumo da maioria dos consumidores, o que implica como consequência a necessidade de respostas rápidas das indústrias alimentares às mudanças do mercado consumidor (Athayde 1999).

O consumidor actual apresenta um perfil com grandes expectativas em termos de qualidade, serviços e design, além do desejo por preços baixos. Esta realidade conduz a uma preocupação com a garantia da qualidade, exigindo a mesma em todas as etapas do processo de desenvolvimento do produto. O objectivo final nesse processo é a total satisfação do consumidor, envolvendo principalmente a qualidade intrínseca do produto, preço, segurança, facilidade de uso, etc (Morrison 1997). Em virtude de tal facto, as indústrias precisam inovar ou desenvolver produtos que antecipem essas necessidades para surpreender o consumidor e ganhar quota de mercado à concorrência (Athayde 1999).

As microalgas fazem parte de um grupo muito heterogéneo de organismos que se caracterizam por serem fotossintéticos e que combinam água e dióxido de carbono atmosférico com luz solar para produzirem várias formas de energia e biomassa (proteínas, hidratos de carbono, etc.). As microalgas são capazes de aumentar o conteúdo nutricional de preparados alimentares convencionais e, conseqüentemente, afetar positivamente a saúde de humanos e animais.

A *Chlorella* e a *Spirulina* dominam o mercado das microalgas. Durante as décadas passadas, a biomassa microalgal foi predominantemente utilizada no mercado de medicamentos naturais e nutracêuticos. Mais de 75% da produção de biomassa anual foi usada pelos fabricantes de pós, tabletes, cápsulas ou pastilhas. Comparando com os medicamentos naturais e nutracêuticos, os alimentos funcionais produzidos com biomassa microalgal são sensorialmente mais convenientes e variados. Assim, combinam os benefícios para a saúde e conveniência para o consumidor.

O presente trabalho surge como resposta a uma solicitação da empresa LUSITECA que pretende ampliar o seu portfólio de produtos. Trata-se de uma empresa dinâmica, que reconhece o valor da inovação e que estabeleceu um protocolo com o Instituto Superior de Agronomia para o desenvolvimento do presente trabalho.



O objetivo principal deste trabalho foi desenvolver um produto de confeitaria contendo duas microalgas - *Chlorella vulgaris* e *Spirulina platensis* - em diversas concentrações. Subjacente a este objetivo principal pretendeu-se estudar o comportamento do produto desenvolvido em quatro condições de conservação diferentes. Para tal, avaliaram-se os parâmetros de cor, humidade, atividade da água ( $a_w$ ), atividade antioxidante e análise sensorial ao longo das condições de conservação referidas. Por fim, pretendeu-se comparar os produtos desenvolvidos com as duas microalgas utilizadas.

## 1. CONSIDERAÇÕES TEÓRICAS

### 1.1. INDÚSTRIA CONFEITEIRA: O CASO DOS REBUÇADOS

Os rebuçados, na sua forma básica de sacarose e glucose, são frequentemente referidos como sendo amorfos ou vítreos devido à ausência de estrutura cristalina. Assim, os rebuçados diferem de muitos outros produtos de confeitaria como os *fondants* e doces de chocolate, que contêm cristais de sacarose e de gordura. Os rebuçados recebem o tratamento térmico mais elevado e têm o conteúdo de humidade mais baixo de todos os doces (Chalmers 1983).

Os rebuçados podem ser de diversos tipos. O mais comum é a combinação de açúcar e xarope de milho cozinhados em conjunto para um conteúdo de humidade de 1 a 3%, com adição de ácido cítrico, cor e sabor (Chalmers 1983).

Os rebuçados são um xarope altamente viscoso, super saturado e com um teor de humidade muito baixo. Embora se encontre no estado sólido, consegue manter algumas características de fluido. O tipo de processamento do xarope base condiciona as características sensoriais, de textura e de imagem do rebuçado (Chalmers 1983).

O objectivo da **produção** de rebuçados é utilizar ingredientes e condições que permitam que o produto seja transformado sem aparente evidência de forma cristalina numa massa amorfa e homogénea, mais ou menos translúcida, geralmente denominada vítrea (Boutin 2000).

Os ingredientes e as proporções para a elaboração de rebuçados usadas são a sacarose (líquida ou cristalina), que perfaz cerca de 50 a 70% dos hidratos de carbono, e o xarope de milho parcialmente hidrolisado, que completa os restantes 30-50%. O açúcar invertido também tem sido utilizado como inibidor de cristalização, mas não é tão eficiente como xarope de milho (Boutin 2000).

O procedimento de cozedura normal é misturar a sacarose e o xarope de milho sob aquecimento, geralmente com recurso ao vácuo, para reduzir a humidade a 2% ou até menos. A massa é arrefecida ligeiramente e misturam-se corantes, essências e acidificantes enquanto a massa ainda está suficientemente plástica (Boutin 2000).

Enquanto ainda está maleável, a massa quente é comprimida na forma desejada ou formada por moldagem e corte. Para completar o processo usual segue-se o arrefecimento e embalamento (Boutin 2000).

## **1.2. CONFEITARIA FUNCIONAL**

A confeitaria funcional pode ser definida como “item de confeitaria que foi submetido à adição, remoção ou substituição de ingredientes da confecção padrão por um ou mais ingredientes que cumprem uma função fisiológica específica ou conferem um potencial benefício à saúde” (Pickford e Jardine 2000).

O mercado para a confeitaria funcional ainda está a dar os primeiros passos mas já apresenta alguns sectores bem desenvolvidos. Os primeiros tipos de doces funcionais modernos foram os rebuçados para a garganta e refrescantes de hálito. Estes foram seguidos pelos doces concebidos para curar uma variedade de doenças como enjoos em viagens ou melhorar a saúde oral, ou doces para auxiliar o controlo de peso (Pickford e Jardine 2000).

### **1.2.1. Desenvolvimento e fabrico de produtos**

Existe um obstáculo de ordem regulamentar, que tem de ser enfrentado para se proceder ao desenvolvimento de um produto de confeitaria funcional. No entanto, é um factor importante a considerar no início da fase de desenvolvimento, uma vez que pode determinar a potencial viabilidade concepção do produto. A atitude do consumidor perante a aceitação de um produto também tem que ser estudada e interpretada numa fase inicial. O conceito é entendido, e encaixa-se de modo adequado num produto de confeitaria? Outra questão, esta de ordem tecnológica, é a forma como o ingrediente funcional pode ser incorporado na confecção, e também que quantidade necessita ser incorporada na hipótese de virem a ser alegadas indicações em relação à sua eficácia. Mesmo numa fase inicial deve ter-se em consideração aspectos relacionados com o retalho e com o preço do produto. A manutenção da qualidade também necessita ser bem definida, já que o sector da confeitaria é geralmente caracterizado por um tempo de prateleira bastante prolongado. Outro aspecto que não deve ser esquecido nesta fase de concepção do produto são as questões de regulamentação e segurança (Pickford e Jardine 2000).

### **1.2.2. Desenvolvimento de uma formulação de produto**

A formulação de um produto de confeitaria funcional começa de igual modo ao dos produtos de confeitaria convencionais: a criação de uma fórmula para um produto saboroso. Onde a confeitaria funcional concentra as atenções, podem ser seguidas as seguintes etapas:

- Escolha de um produto “veículo”

Este aspecto é definido, em certa medida, pelo conceito do produto. O custo dos ingredientes funcionais adicionados pode ser dispendioso, pelo que é desejável manter o método de fabrico o mais simples possível.

- Onde incorporar os ingredientes funcionais no produto

Este aspecto depende da quantidade de ingredientes funcionais necessários, a natureza dos ingredientes, como ser líquido ou em pó, partículas finas ou grandes; se vão se afectados por certas condições de processamento (altas temperaturas, acção de corte). Como se comportam num meio aquoso ou à base de gordura e se os ingredientes funcionais vão interagir com outros ingredientes da formulação.

- Manipulação de ingredientes

Quaisquer ingredientes que tenham de ser excluídos ou reduzidos/diluídos, para dar lugar a ingredientes funcionais, não devem resultar em deterioração do sabor do produto, prazo de validade ou qualidade.

- Agentes tecnológicos

A formulação pode necessitar a adição de agentes tecnológicos para atenuar algum sabor indesejável dos ingredientes funcionais, como por exemplo, aromas.

- Como é que os ingredientes funcionais afectam os parâmetros críticos do produto

É necessário considerar parâmetros como teor de humidade, sólidos totais, HRE (Humidade Relativa de Equilíbrio), pH,  $a_w$ , resistência do gel, viscosidade, textura ou cristalização (Pickford e Jardine 2000).

### 1.2.3. Limitações do processamento

Quando um produto sofre a mudança da escala piloto para o ambiente fabril surgem várias dificuldades, algumas das quais são agravadas pela presença dos ingredientes funcionais. A título de exemplo, alguns ingredientes funcionais podem causar descoloração do produto durante a produção em fábrica, e que não ocorreu à escala piloto. Além disso, em ambiente fabril é possível usar um mecanismo de dosagem do produto. Se todos os ingredientes puderem estar sob a forma de um *pré-mix* e ser doseados numa fase de produção simples ou misturados com outros ingredientes padrão, é o ideal. O doseamento é mais difícil se a natureza dos ingredientes funcionais significar que podem apenas ser adicionados numa fase específica do processamento por serem sensíveis ao calor ou ao pH, por exemplo (Pickford e Jardine 2000).

Quando um produto acabado sai da linha de produção, pode ser necessário submetê-lo a testes analíticos para garantir que os níveis dos ingredientes activos estão de acordo com a especificação. Devem ser desenvolvidos testes que sejam de confiança, de baixo custo, rápidos e o mais simples possível de executar. Qualquer atraso ou incorrecção nos testes pode resultar em potenciais perdas de produto e ingredientes funcionais de custo elevado (Pickford e Jardine 2000).

### 1.2.4. Definição do conceito do produto

O entendimento do consumidor é a chave para o sucesso. Quanto menos o consumidor entender o conceito subjacente a um produto, maior é a probabilidade de apenas se conseguir atingir um nicho de mercado. Na linguagem de marketing, tais produtos são destinados a ser inovadores na sociedade. A esperança é que essas inovações influenciem um grupo maior a comprar o produto. Estes formadores de opiniões podem então influenciar um público mais vasto a aceitar o produto. O lançamento de produtos pode ser um acto de fé de que o consumidor vai entender o conceito inerente aos ditos produtos. Como estão em causa conceitos funcionais, muitos irão necessitar de ser explicados ao consumidor e em muitos casos o fabricante vai ter de se focar inicialmente num pequeno nicho de mercado. Consequentemente, no início é natural que os produtos apenas sejam encontrados em retalhistas da especialidade (Pickford e Jardine 2000).

Publicitar um conceito é uma maneira de contornar este dilema, mas o sucesso imediato não é garantido e é necessária uma campanha a longo termo. Em qualquer dos casos, a publicidade pode não ser bem sucedida, e de facto pode ser vista com algum cepticismo pelo consumidor na ausência de compreensão. Tal facto resulta da não familiarização com o conceito e este necessitar de ser explicado ao consumidor. Enquanto que a publicidade pode ser vista como o primeiro recurso das empresas líderes de mercado, começa a ser perceptível que a comunicação

de novos conceitos aos consumidores tem de ser feita pacientemente. Para tal podem ser usados os meios de comunicação como veículo de conceitos científicos subjacentes. Também é necessário ter feedback da comunidade científica. Este facto, para além de tranquilizar os consumidores, adiciona credibilidade ao produto e ajuda a dissipar algumas dúvidas que as novas ideias podem atrair (Pickford e Jardine 2000).

### **1.2.5. Marketing da confeitaria funcional**

O desenvolvimento de qualquer produto implica muito mais do que apenas obter a formulação correcta do produto. O produto deve chegar ao mercado com um conceito claro para o consumidor e uma personalidade visível. Os seus benefícios para o consumidor devem ser óbvios. Deve ser identificado o consumidor alvo e onde, quando e em que circunstância vai ser comprado. Deve ser identificado o tipo de ponto de venda, como é que o produto pode ser diferenciado da concorrência, bem como atrair o consumidor. Qualquer produto novo vai enfrentar competição feroz de produtos já existentes, mesmo no que diz respeito à zona de colocação nas prateleiras. Não surpreende então que a maioria dos novos produtos tenha um período de vida curto (Pickford e Jardine 2000).

O tema da marca: face a esta questão, e como grande parte da confeitaria funcional vai conter novos conceitos e propostas, pode requerer a criação de novas marcas. No entanto, o lançamento de novas marcas pode ser um processo dispendioso, devido aos custos de publicidade e promoção para vender o conceito ao consumidor. Um modo de contornar este desafio é lançar o produto sob a “protecção” de uma marca já existente. Esta abordagem pode ser muito bem sucedida se o fabricante possuir uma marca apropriada. Existem alguns constrangimentos com esta abordagem, como é o caso da necessidade do produto se encaixar na personalidade global da marca (Pickford e Jardine 2000).

### **1.2.6. Aspectos de retalho**

O fabricante de confeitaria funcional precisa de definir o tipo de ponto de venda apropriado para o produto. Muitos produtos de confeitaria funcional não ganham acesso ao mercado de massa da confeitaria como são os supermercados e lojas de conveniência. Os candidatos mais prováveis para essas áreas serão os produtos funcionais, que são extensões de marcas actualmente conhecidas. Ainda assim, os retalhistas (especialmente os supermercados) vão monitorizar a sua performance para garantir que o produto conquista o seu espaço (Pettit 1999).

Produtos com propósito terapêutico vão ser, frequentemente, colocados em farmácias ou secções de farmácia/saúde nos supermercados. Produtos com conotação dietética podem adequar-se melhor em locais de saúde e beleza (Pettit 1999).

Os produtos cujos conceitos são apenas entendidos por inovadores podem, por vezes, ser confinados a lojas especialistas como é o caso das lojas de alimentos saudáveis. Os produtos com pontos de venda limitados vai implicar pequenos volumes, mas o sucesso dentro do nicho desta área pode persuadir retalhistas maiores a abastecerem-se com estes produtos. Deste modo, os produtos de nicho podem tornar-se a fonte principal de negócio. Um exemplo bem sucedido é o dos rebuçados Ricola, com ervas, em Espanha, que se estendeu para as lojas tradicionais em 1996, tendo sido anteriormente apenas vendido através de farmácias, onde manteve uma quota de 64% do sector (Pettit 1999).

### **1.2.7. Alegações acerca do produto**

Uma das partes cruciais da identidade de um produto é o seu conceito, ou seja, o que é que ele pode fazer pelo consumidor. Este aspecto precisa de ser bem comunicado. No entanto, em muitos mercados, existem restrições nas alegações.

As alegações de saúde são difíceis de efectuar em muitos mercados, sendo que na Europa já existe o Regulamento (UE) N.º 432/2012 que regula as alegações nutricionais e de saúde efetuadas em alimentos.

Antes da existência de regulamentação nesta área tornava-se claro que esta era uma área que constituía uma barreira para o aumento da confusão no consumidor face ao impacto do produto.

### **1.3. MICROALGAS**

#### **1.3.1. Características**

As algas incluem formas microscópicas (microalgas) e macroscópicas (macroalgas). Em termos de diversidade em tamanho, as algas variam desde o picoplâncton de apenas 0,2 – 2,0 µm em diâmetro, até algas gigantes com ramagens até 60 m de comprimento. O número de espécies de algas foi estimado entre 1 a 10 milhões, sendo que a maior parte são microalgas (Barsanti e Gualtieri 2006). O número exacto de espécies de microalgas ainda é desconhecido. Actualmente são encontrados relatos de que podem existir entre 200.000 até alguns milhões de representantes deste grupo. Tal diversidade também se reflecte na composição bioquímica e, assim, as microalgas são fonte de uma vasta gama de produtos (Pulz e Gross 2004).

As microalgas fazem parte de um grupo muito heterogéneo de organismos. São predominantemente aquáticos e geralmente microscópicos unicelulares, podendo formar colónias, e apresentar pouca ou nenhuma diferenciação celular. A sua coloração variada é característica devido à presença de pigmentos e de mecanismos fotoautotróficos (Olaizola 2003). As microalgas caracterizam-se por serem microrganismos fotossintéticos que combinam água e dióxido de carbono atmosférico com luz solar para produzirem várias formas de energia e biomassa (proteínas, lípidos, hidratos de carbono, etc.) (Hoek, Mann e Jahns 1995, Chisti 2007 e Andrade e Costa 2008). A composição desta biomassa está relacionada com a natureza de cada espécie de microalga, bem como com os factores ambientais da região onde se faz o cultivo e com o meio de cultura utilizado (Miao e Wu 2006).

Além das suas características naturais, outros aspectos importantes das microalgas são o seu fácil cultivo, o rápido crescimento e a possibilidade de controlar a produção de alguns compostos bioactivos pela manipulação das condições de cultivo (Priyadarshani e Rath 2012). São principalmente encontradas no meio marinho, em água doce e no solo, sendo consideradas responsáveis por, pelo menos, 60% da produção primária da Terra (Richmond 2004).

#### **1.3.2. Classificação**

As microalgas têm sido tradicionalmente classificados quanto ao tipo de pigmentos, a natureza química dos produtos de reserva e pelos constituintes da parede celular, mas também têm sido considerados aspectos citológicos e morfológicos (Richmond 2004).

As algas são plantas inferiores, sem estruturas como folhas, raízes e caules. Na classificação moderna, baseada na filogenética molecular, as algas não são classificadas sob o Reino Plantae



embora se assemelhem muito com as plantas superiores (Graham e Wilcox 2000). As algas eucariotas encontram-se agrupadas sob o Reino Protista enquanto que algas procariotas (cianobactérias) estão classificadas como bactérias (Reino Monera) (Barsanti e Gualtieri, 2006).

Filogeneticamente, as microalgas podem ser procariotas ou eucariotas e, em termos evolucionários, recente ou muito antiga (Olaizola 2003). Com estrutura procariota encontram-se representadas as Divisões Cyanophyta (cianobactérias) e Prochlorophyta. Por outro lado, com estrutura eucariota, estão representadas as Divisões Chlorophyta, Euglenophyta, Rhodophyta, Prymnesiophyta, Heterokontophyta, Cryptophyta e Dinophyta (Hoek, Mann, e Jahns, 1995 e Pulz e Gross, 2004). Apesar das diferenças estruturais e morfológicas entre os representantes de cada divisão, estes são fisiologicamente semelhantes e apresentam um metabolismo análogo aos das plantas (Abalde, Cid e Fidalgo 1995).

### 1.3.3. Composição nutricional das microalgas

As microalgas são capazes de aumentar o conteúdo nutricional de preparados alimentares convencionais e, conseqüentemente, afectar positivamente a saúde de humanos e animais. Este facto deve-se à sua composição química original. A Tabela 1 apresenta uma comparação da composição geral de fontes alimentares humanas com as de diferentes algas (Spolaore, et al. 2006).

**Tabela 1.** Composição geral de diferentes fontes alimentares humanas e microalgas (% de massa seca)

Matéria-prima	Proteína (%)	Hidratos de carbono (%)	Lípidos (%)
Fermento	39	38	1
Carne	43	1	34
Leite	26	38	28
Arroz	8	77	2
Soja	37	30	20
<i>Anabaena cylindrica</i>	43-56	25-30	4-7
<i>Chlamydomonas</i>	48	17	21
<i>Chlorella vulgaris</i>	51-58	12-17	14-22
<i>Dunaliella salina</i>	57	32	6
<i>Porphyridium cruentum</i>	28-39	40-57	9-14
<i>Scenedesmus obliquus</i>	50-56	10-17	12-14
<i>Spirulina maxima</i>	60-71	13-16	6-7
<i>Synechococcus</i> sp.	63	15	11

Fonte: Adaptado de Richmond (2004)

O alto conteúdo de **proteína** de várias espécies de microalgas é uma das principais razões para as considerar uma fonte não convencional de proteína (Soletto, et al. 2005). O padrão de aminoácidos de quase todas as algas é favoravelmente comparável com os de outras proteínas alimentares, conforme é possível verificar na Tabela 2. Como as células são capazes de

sintetizar todos os aminoácidos, podem fornecer aqueles que são essenciais aos humanos e animais (Guil-Guerrero, *et al.* 2004).

**Tabela 2.** Perfil de aminoácidos de diferentes microalgas comparados com fontes de proteína convencionais e a referência padrão (g/100 g de proteína) da WHO/FAO (1973)

Fonte	Ile	Leu	Val	Lis	Fen	Tir	Met	Cis	Tri	Tre	Ala	Arg	Asp	Glu	Gli	His	Pro	Ser
WHO/FAO	4,0	7,0	5,0	5,5					1,0									
Ovo	6,6	8,8	7,2	5,3	5,8	4,2	3,2	2,3	1,7	5,0	-	6,2	11,0	12,6	4,2	2,4	4,2	6,9
Soja	5,3	7,7	5,3	6,4	5,0	3,7	1,3	1,9	1,4	4,0	5,0	7,4	1,3	19,0	4,5	2,6	5,3	5,8
<i>Chlorella vulgaris</i>	3,8	8,8	5,5	8,4	5,0	3,4	2,2	1,4	2,1	4,8	7,9	6,4	9,0	11,6	5,8	2,0	4,8	4,1
<i>Dunaliella bardawil</i>	4,2	11,0	5,8	7,0	5,8	3,7	2,3	1,2	0,7	5,4	7,3	7,3	10,4	12,7	5,5	1,8	3,3	4,6
<i>Scenedesmus obliquus</i>	3,6	7,3	6,0	5,6	4,8	3,2	1,5	0,6	0,3	5,1	9,0	7,1	8,4	10,7	7,1	2,1	3,9	3,8
<i>Arthrospira máxima</i>	6,0	8,0	6,5	4,6	4,9	3,9	1,4	0,4	1,4	4,6	6,8	6,5	8,6	12,6	4,8	1,8	3,9	4,2
<i>Spirulina platensis</i>	6,7	9,8	7,1	4,8	5,3	5,3	2,5	0,9	0,3	6,2	9,5	7,3	11,8	10,3	5,7	2,2	4,2	5,1
<i>Aphanizomenon</i> sp.	2,9	5,2	3,2	3,5	2,5	-	0,7	0,2	0,7	3,3	4,7	3,8	4,7	7,8	2,9	0,9	2,9	2,9

Fonte: Becker (2007)

Os **hidratos de carbono** nas microalgas podem ser encontrados na forma de amido, glucose, açúcares, e outros polissacáridos. No geral, a sua digestibilidade é alta e daí não haver limitação no uso do pó integral das microalgas em alimentos ou rações (Richmond 2004).

O conteúdo médio de **lípidos** das células das microalgas varia entre 1 a 70%, mas podem alcançar os 90% de peso seco sob certas condições de produção (Metting 1996). A fração lipídica é composta por glicerol, açúcares ou bases esterificadas aos ácidos gordos saturados e insaturados. De entre todos os ácidos gordos das microalgas, alguns das famílias  $\omega 3$  e  $\omega 6$  são de particular interesse. O conteúdo total e a proporção de ácidos gordos podem ser afectados por factores nutricionais e ambientais, limitação de azoto, entre outros (Tonon, *et al.* 2002). Algumas das microalgas marinhas são uma potencial fonte de ácidos gordos polinsaturados (PUFA) de cadeia longa (Tabela 3), especialmente o ácido eicosapentaenóico (EPA) e o ácido docosahexaenóico (DHA) que têm sido associados a efeitos benéficos na prevenção de doenças cardiovasculares. A fonte convencional de tal PUFA de cadeia longa é a fração lipídica. No entanto, os peixes não sintetizam esses ácidos gordos, mas podem adquiri-los através da dieta, que consiste em microalgas marinhas (Arterburn, *et al.* 2008).

**Tabela 3.** Ácidos Gordos Polinsaturados particularmente interessantes

Ácidos Gordos Polinsaturados	Estrutura	Aplicação potencial	Microalga produtora
Ácido $\gamma$ - linolénico (GLA)	18:3 $\omega$ 6, 9, 12	Fórmulas infantis para lactentes a termo Suplementos nutricionais	<i>Arthrospira</i>
Ácido araquidónico (AA)	20:4 $\omega$ 6, 9, 12, 15	Fórmulas infantis para lactentes a termo/prematuros Suplementos nutricionais	<i>Porphyridium</i>
Ácido eicosapentaenóico (EPA)	20:5 $\omega$ 3, 6, 9, 12, 15	Suplementos nutricionais Aquacultura	<i>Nannochloropsis</i> , <i>Phaeodactylum</i> , <i>Nitzschia</i>
Ácido docosahexoenóico (DHA)	22:6 $\omega$ 3, 6, 9, 12, 15, 18	Fórmulas infantis para lactentes a termo/prematuros Suplementos nutricionais Aquacultura	<i>Cryptocodinium</i> , <i>Schizochytrium</i>

Fonte: Spolaore, *et al.* (2006)

As microalgas também representam uma fonte vital de quase todas as **vitaminas** essenciais (A, B1, B2, B6, B12, C, E, nicotinato, biotina, ácido fólico e ácido pantoténico) (Richmond 2004). As vitaminas aumentam o valor nutricional das algas, mas as suas quantidades variam com factores ambientais, tratamento de colheita e o método de secagem das células (Brown, *et al.* 1999).

Analogamente ao que ocorre em outros organismos, cada classe de microalgas apresenta a sua combinação de **pigmentos** e, por consequência, cor diferente. Os três principais grupos de pigmentos encontrados em biomassa microalgal são as clorofilas (0,5 a 1% de peso seco), os carotenóides (0,1 a 0,2% de peso seco em média) e as ficobiliproteínas (Abalde, Cid, e Fidalgo, 1995 e Spolaore, *et al.* 2006).

As **clorofilas** são pigmentos de cor verde muito comuns em legumes e em várias frutas. Devido à sua cor e propriedades físicas e químicas também são usadas como aditivos para produtos alimentares. Estes pigmentos são quimicamente instáveis e podem ser alterados ou destruídos facilmente, modificando a percepção e a qualidade dos produtos. Em geral, as clorofilas são relativamente instáveis e sensíveis à luz, aquecimento, oxigénio e a degradação química. As clorofilas são também usadas como corantes naturais e antioxidantes para restabelecer o teor natural destas moléculas em produtos alimentares ou para preparar produtos enriquecidos (Streit, *et al.* 2005).

A clorofila é um dos compostos bioativos valioso que podem ser extraídos da biomassa microalgal. É usada como corante alimentar natural e possui propriedades antioxidantes e antimutagénicas (Priyadarshani e Rath 2012). São moléculas formadas por complexos derivados de porfirina, tendo como átomo central o Magnésio (Mg) (Streit, *et al.* 2005).

A clorofila *a* está presente em todos os organismos que realizam fotossíntese aeróbia. Esta clorofila *a* é o pigmento utilizado para realizar o primeiro passo do processo fotossintético, enquanto que os restantes pigmentos auxiliam na absorção de luz e na transferência de energia radiante para os centros de reação, sendo assim denominados de pigmentos acessórios. Os principais pigmentos acessórios também incluem outros tipos de clorofila: clorofila *b* (presente em algas verdes); clorofila *c* (presente nas feófitas e diatomáceas); e clorofila *d* (presente em algas vermelhas) (Streit, *et al.* 2005).

Os **carotenóides** nas algas servem principalmente como pigmentos acessórios na fotossíntese e derivam de unidades de isopreno de 5 carbonos que estão polimerizados enzimaticamente para formar estruturas altamente conjugadas de 40 carbonos (Pulz e Gross 2004). Os compostos que apenas consistem de hidrocarbonetos formam os carotenos, enquanto que aqueles com os grupos oxo, hidroxilo e epóxi são denominados xantofilas. Dos 400 carotenóides conhecidos, os principais tipos que têm sido usados comercialmente incluem o  $\beta$ -caroteno e a astaxantina e, em menor extensão, a luteína, a zeaxantina e o licopeno (Spolaore, *et al.* 2006). O  $\beta$ -caroteno é um pigmento que geralmente é encontrado numa fracção inferior a 1% de massa seca, mas pode ser acumulado até 10% em espécies halotolerantes (Abalde, Cid e Fidalgo 1995).

Os carotenóides são usados como corante alimentar natural e aditivo para rações de animais, bem como na cosmética. Em termos de relevância nutricional, certos carotenóides, especialmente o  $\beta$ -caroteno, actua como pro-vitamina A. Os carotenóides são ainda conhecidos por ter valor terapêutico, incluindo atividades anti-inflamatórias e anti-cancerígenas, que são largamente atribuídas às suas propriedades antioxidantes (Chu 2011).

As **ficobiliproteínas** são um pigmento fotossintético solúvel em água encontrado em algas como cianobactérias. Existem três grandes tipos de ficobiliproteínas denominadas ficocianinas, aloficocianinas e ficoeritrinas que diferem no seu espectro de propriedades. O conteúdo das ficobiliproteínas nas microalgas varia com as condições ambientais, especialmente com a intensidade e qualidade espectral da luz (Romay e Gonzalez 2000).

Estudos recentes mostram que a ficocianina tem propriedades promotoras de saúde e uma ampla gama de aplicações farmacêuticas. Os efeitos benéficos do pigmento são principalmente devido à sua atividade antioxidante. O potencial antioxidante da ficocianina mostrou ser 16 vezes mais

eficiente que o trolox (análogo da vitamina E) e 20 vezes mais eficaz que a vitamina C baseado no seu efeito protector nos eritrócitos humanos contra a lise induzida pelas peroxilas (Romay e Gonzalez 2000).

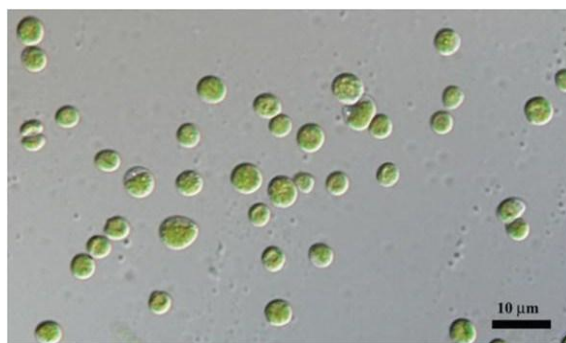
### 1.3.5. *Chlorella vulgaris*

Em 1890, o investigador alemão Martinus Willem Beijerinck, foi o primeiro a descobrir a *Chlorella vulgaris* como sendo a primeira microalga com um núcleo bem definido. A sua classificação taxonómica encontra-se descrita na Tabela 4 (Safi, et al. 2014).

**Tabela 4.** Classificação taxonómica da microalga *Chlorella vulgaris*

<b>Domínio</b>	Eucariota
<b>Reino</b>	Protista
<b>Divisão</b>	Chlorophyta
<b>Classe</b>	Trebouxiophyceae
<b>Ordem</b>	<i>Chlorellales</i>
<b>Família</b>	Chlorallaceae
<b>Género</b>	<i>Chlorella</i>
<b>Espécie</b>	<i>Chlorella vulgaris</i>

A *Chlorella vulgaris* é uma célula microscópica esférica com 2-10 µm de diâmetro (Figura 1) e tem diversos elementos estruturais semelhantes aos das plantas (Safi, et al. 2014).



**Figura 1.** Observação microscópica da microalga *Chlorella vulgaris*

**Fonte:** Held e Raymond (2014)

A *Chlorella vulgaris* tem sido utilizada como uma medicina alternativa no Extremo Oriente desde há muito tempo e é conhecida como um alimento tradicional no Oriente (Yamaguchi 1997). É produzida e comercializada em grande escala como suplemento alimentar em muitos

países, como a China, Japão, Europa e os Estados Unidos da América. A *Chlorella* está a ser considerada como uma fonte potencial de uma vasta gama de nutrientes, sendo bastante utilizada no mercado de alimentos saudáveis bem como para rações animais e aquacultura (Yamaguchi 1997).

A biomassa de *Chlorella vulgaris* já foi utilizada experimentalmente na alimentação, sobretudo como agente corante. Neste âmbito destaca-se o sucesso obtido na coloração de gema de ovo (Gouveia, *et al.* 1996a) que viria a fomentar mais estudos na aplicação de microalgas. O mesmo autor voltou a efetuar mais estudos, desta feita com ênfase no potencial de pigmentação de peixes como a truta (Gouveia, *et al.* 1996b), a dourada (Gouveia, *et al.* 2002) e ainda carpas e peixes dourados (Gouveia, *et al.* 2003).

Mais tarde viria a ser estudada a incorporação de biomassa de *Chlorella vulgaris* (bem como outras microalgas) em emulsões alimentares (Gouveia, *et al.* 2005) com o objetivo de conferir capacidade antioxidante e funcionar como agente corante. Neste sentido destaca-se Batista (2013) que contribuiu largamente para o estudo das propriedades de reologia, textura e cor das emulsões obtidas. Os resultados mostraram boas indicações e também se estudou a incorporação de *Chlorella vulgaris* em bolachas (Gouveia, *et al.* 2007). Todos estes trabalhos desenvolvidos mostraram boa estabilidade das diferentes propriedades dos produtos na presença da microalga, revelando o potencial existente para a aplicação de microalgas em muitos mais produtos, com estrutura e composição muito distintas.

O perfil nutricional da biomassa desta microalga é bastante rico em lípidos e proteínas (Tabela 5), embora também contenha quantidades assinaláveis de vitaminas e minerais.

Resultados mais recentes de Batista (2013) revelaram uma composição química da *Chlorella vulgaris* algo diferente das restantes. Contudo, este facto deve estar relacionado com o meio de cultivo de cada microalga, o que confere grande variabilidade de composição química final.

**Tabela 5.** Composição química da matéria seca de *Chlorella vulgaris*

Componente	Referência			
	(Panahi, <i>et al.</i> 2012)	(Halle, <i>et al.</i> 2009)	(Tokusoglu e Unal 2003)	(Batista 2013)
Energia (kJ/100 g)	1423,51	1291	1427,30	-
Proteína (g/100 g)	52,0	60,6	47,82	38,0
Hidratos de carbono (g/100 g)	13,6	5,6	8,08	19,9
Lípidos (g/100 g)	8,65	8,1	13,32	5,1
Cinzas (g/100 g)	6,56	9,1	6,30	24,2
Humidade (g/100 g)	3,63	3,06	3,87	11,2
Fibra (g/100 g)	15,6	20,8	-	-
<b>Ácidos gordos</b>				
Saturados (g/100 g)	2,16	2,03	2,95	1,581
Monoinsaturados (g/100 g)	1,69	1,27	4,72	1,071
Polinsaturados (g/100 g)	3,34	4,74	5,19	1,785
Trans (g/100 g)	0,06	-	-	-
<b>Pigmentos</b>				
Luteína (mg/100 g)	84,3	-	-	-
Licopeno (mg/100 g)	0,307	-	-	-
Zeaxantina (mg/100 g)	0,679	-	-	-
Clorofila	15,21	-	-	-
B-caroteno (mg/100 g)	180,8	-	-	-
<b>Vitaminas</b>				
Vitamina B1 (mg/100 g)	1,5	-	-	-
Vitamina B2 (mg/100 g)	4,8	-	-	-
Vitamina B3 (mg/100 g)	23,8	-	-	-
Vitamina B5 (mg/100 g)	1,3	-	-	-
Vitamina B6 (mg/100 g)	1,7	-	-	-
Vitamina B12	125,9	-	-	-
Vitamina C (mg/100 g)	15,6	-	-	-
Ácido fólico	26,9	-	-	-
Biotina	191,6	-	-	-
<b>Minerais</b>				
Fósforo (mg/100 g)	959	-	1761,5	1530
Potássio (mg/kg)	21450	22600	499,2	9800
Magnésio (mg/kg)	4425	3880	3443	14600
Cálcio (mg/kg)	2710	5810	5937	47300
Ferro (mg/kg)	680	1720	2591	166,3
Cobre (mg/kg)	19,0	26	0,6	2,2
Zinco (mg/kg)	54,5	145	119	17,5
Manganésio (mg/kg)	39,5	150	20,9	471,5
Iodo (mg/kg)	12,9	0,5	-	-
Crómio (mg/kg)	0,575	-	0,2	-
Sódio (mg/kg)	-	-	13464	9800
Selénio (mg/kg)	-	-	0,7	-
Polifenóis (g/100 g)	-	0,4	-	-

A clorofila é o pigmento mais abundante na *Chlorella vulgaris* e o seu conteúdo pode alcançar 1- 2% de massa seca (Tabela 6). Esta microalga também contém quantidades importantes de carotenóides que actuam como pigmentos acessórios pela captura de luz. Estes pigmentos têm muitas propriedades terapêuticas, como atividade antioxidante, efeito protector contra a degeneração da retina, regulação de colesterol no sangue, prevenção de doenças crónicas e fortificação do sistema imunitário (Safi, *et al.* 2014).

**Tabela 6.** Conteúdo potencial de pigmentos em *Chlorella vulgaris* sob diferentes condições de crescimento

Pigmentos	µg / g (massa seca)
β-caroteno	7 – 12.000
Astaxantina	550.000
Cantaxantina	362.000
Luteína	52 – 3830
Clorofila- <i>a</i>	250 – 9630
Clorofila- <i>b</i>	72 – 5770
Feofitina- <i>a</i>	2310 – 5640
Feofitina- <i>b</i>	Não disponível
Violaxantina	10 – 37

Fonte: Safi, *et al.* (2014)

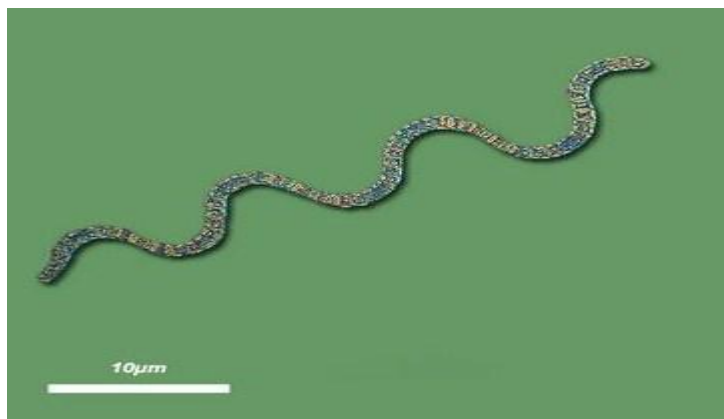
A *Chlorella vulgaris* apresenta também um importante perfil de vitaminas que são elementos-chave para o crescimento e diferenciação celular no corpo humano (Vitamina A). Também possui atividade antioxidante que actua como sequestrador de radicais juntamente com a melhoria de circulação sanguínea e controlo das funções musculares (Vitaminas E e C) (Safi, *et al.* 2014).

A *Chlorella* é importante como factor de promoção de saúde sendo importante para a prevenção e cura de diversas patologias, tais como úlceras gástricas, feridas, obstipação, anemia, hipertensão, diabetes, desnutrição infantil e neuroses. Também é atribuída uma acção preventiva contra a aterosclerose e hipercolesterolemia pelos glicolípidos e fosfolípidos, e acções anti-tumor pelas glicoproteínas, péptidos e nucleótidos (Yamaguchi 1997). A substância ativa mais importante na *Chlorella* é o β-1,3-glucano, que é um imunoestimulador activo, sequestrador de radicais livres e um redutor de lípidos no sangue (Spolaore, *et al.* 2006).



### 1.3.6. *Spirulina platensis*

O género *Arthrospira* (comercialmente referida como *Spirulina*) abrange um grupo de cianobactérias filamentosas que se caracterizam por uma cadeia de células sob forma de espiral (Figura 2) e daí a origem do nome *Spirulina* (Taylor e Francis 1997).



**Figura 2.** Observação microscópica da microalga *Spirulina platensis*

**Fonte:** Association Algosopnette (s.d.)

A *Arthrospira* (*Spirulina*) cresce em grande quantidade em certos lagos alcalinos no México e África e tem sido usada como alimento pelas populações locais desde as antiguidades (Yamaguchi 1997). A sua classificação taxonómica encontra-se descrita na Tabela 7, sendo que as microalgas deste género são vulgarmente conhecidas como microalgas verde-azuis devido à sua coloração característica (Taylor e Francis 1997).

**Tabela 7.** Classificação taxonómica da microalga *Spirulina platensis*

<b>Domínio</b>	Procariota
<b>Reino</b>	Monera
<b>Divisão</b>	Cyanobacteria
<b>Classe</b>	Cyanophyceae
<b>Ordem</b>	Oscillatoriales
<b>Família</b>	Phormidiaceae
<b>Género</b>	<i>Arthrospira</i> ( <i>Spirulina</i> )
<b>Espécie</b>	<i>Arthrospira</i> ( <i>Spirulina</i> ) <i>platensis</i>

A *Spirulina* é produzida em grande quantidade por todo o mundo e largamente usada em alimentos e suplementos alimentares devido ao seu alto teor de proteína (Tabela 8) e ao seu excelente valor nutritivo, como o Ácido  $\gamma$  – linolénico (Ötles e Pire 2001 e Shimamatsu 2004). Além disso, esta microalga tem vários efeitos promotores de saúde: redução da hiperlipidemia, supressão de hipertensão, proteção contra falência renal, promoção de crescimento de

*Lactobacillus intestinalis*, supressão de nível elevado de glucose no soro (Spolaore, *et al.* 2006), efeito anti-cancerígeno e têm ainda propriedades hipocolesterolémicas (Reinehr e Costa 2006).

**Tabela 8.** Composição química da matéria seca de *Spirulina platensis*

Componente	Referência			
	(Gaese 2012)	(Albert, <i>et al.</i> 2012)	(Tokusoglu e Unal 2003)	(Ramadan, Asker e Ibrahim 2008)
Proteína (g/100 g)	64,00	50,24 – 58,61	61,32 – 64,43	-
Hidratos de carbono (g/100 g)	10,00	-	15,09 – 18,81	-
Açúcares (g/100 g)	-	13,8 – 14,2	-	-
Lípidos (g/100 g)	8,00	3,4 – 9,86	7,09 – 8,03	-
Cinzas (g/100 g)	10,00	7,8 – 7,96	7,43 – 10,38	-
Humidade (g/100 g)	-	7,11 – 9,36	3,11 – 4,08	-
Fibra (g/100 g)	8,00	7,55 – 7,78	-	-
<b>Ácidos gordos</b>				
Saturados (g/100 g)	-	-	34,09 – 35,89	45,3
Monoinsaturados (g/100 g)	-	-	36,40 – 39,29	12,5
Polinsaturados (g/100 g)	-	-	22,30 – 25,12	42,2
<b>Pigmentos</b>				
Clorofila total (mg/100 g)	-	725,62 – 973,51	-	-
Clorofila <i>a</i> (mg/100 g)	-	286,32 – 534,03	-	-
Clorofila <i>b</i> (mg/100 g)	-	191,59 – 615	-	-
Carotenóides (mg/100 g)	-	5,68 – 6,63	-	-
Ficocianina (%)	-	10 – 46,435	-	-
<b>Minerais</b>				
Magnésio (mg/100 g)		1,8 – 7,85	368,3 – 399,7	-
Cálcio (mg/100 g)		3,1 – 3,2	703 – 893	-
Manganésio (mg/100 g)		975 – 3220	5,23 – 3,84	-
Ferro (mg/100 g)		683,33 – 1666,6	90,1 – 103,6	-
Zinco (mg/100 g)		216 – 298	2,45 – 3,01	-
Sódio (mg/100 g)		143,75 – 762,5	902,3 – 1897,3	-
Selénio (mg/100 g)		-	0,11 – 0,13	-
Potássio (mg/100 g)		128,12 – 188,87	1326,9 – 1504	-
Fósforo (mg/100 g)		20 – 357,5	703,4 – 802,7	-
Cobre (mg/100 g)		128,12 – 250	0,12 – 0,49	-
Cobalto (mg/100 g)		49,12 – 68,62	-	-
Crómio (mg/100 g)		-	0,09 – 0,15	-
Cádmio (mg/100 g)		-	0,01 – 0,02	-

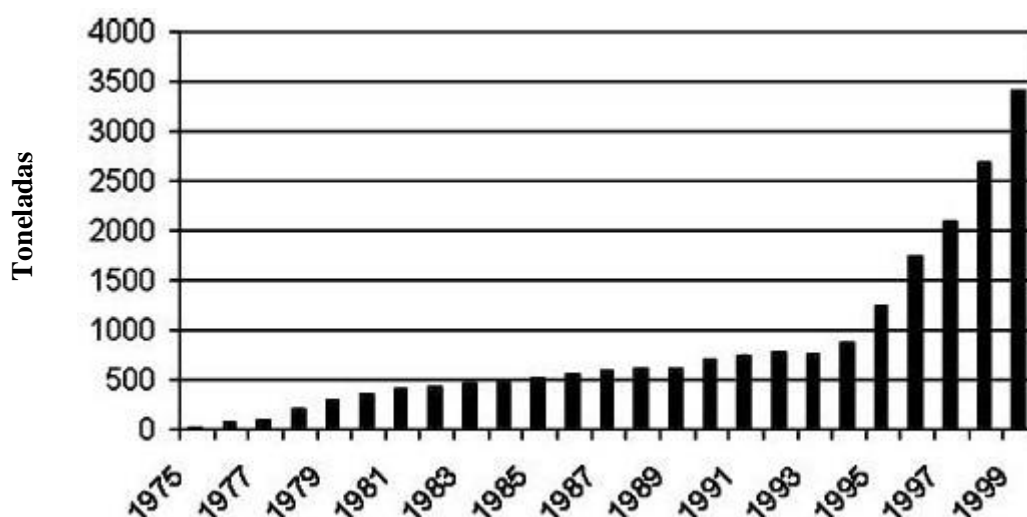
A *Spirulina* é também a fonte principal de ficocianinas naturais que são usadas como corante alimentar e cosmético natural (extracto de cor azul) e como marcador bioquímico em imunoensaios, entre outras aplicações (Ötles e Pire 2001, Kato 1994 e Shimamatsu 2004).

A espécie com mais interesse é a *Arthrospira (Spirulina) platensis* uma vez que é das poucas espécies que tem mais antiguidade na sua utilização como parte da dieta humana (Taylor e Francis 1997).

A ficocianina é um pigmento azul solúvel em água que confere à *Spirulina* a sua tonalidade azulada. Para além de conferir cor também é um potente antioxidante solúvel em água. Cientistas já demonstraram que um extracto de *Spirulina* contendo ficocianina é um potente sequestrador de radicais e inibe a peroxidação de lípidos. A ficocianina na *Spirulina* também mostrou ser promissora no tratamento de cancro em animais e na estimulação do sistema imunitário (Saranraj e Sivasakthi 2014).

### 1.3.7. Aplicações comerciais

A produção mundial de microalgas tem vindo a afirmar-se ao longo dos anos (Figura 3). Dados mais recentes indicam que a produção mundial de *Spirulina* já atinge valores na ordem das 5000 toneladas (Lundquist, *et al.* 2010).



**Figura 3.** Produção (toneladas) mundial de biomassa de *Spirulina* entre os anos de 1975 e 1999

**Fonte:** Borowitzka (1998)

Os produtos predominantes na biotecnologia microalgal são a biomassa das microalgas obtidas por secagem ao sol e por pulverização ou na forma comprimida de pastilhas. Esta biomassa é colhida de águas naturais ou de culturas em lagoas artificiais ou fotobiorreactores. Subsequentemente é realizada a separação do meio de crescimento e efetuada uma secagem. As estimativas aproximadas que se encontram na Tabela 9, mostram as produções de microalgas mais importantes no mundo (Pulz e Gross 2004).

**Tabela 9.** Estado actual da produção de microalgas

Microalga	Produção anual	País produtor
<i>Arthrospira</i>	3000 t de peso seco	China, Índia, EUA, Birmânia, Japão
<i>Chlorella</i>	2000 t de peso seco	Taiwan, Alemanha, Japão
<i>Dunaliella salina</i>	1200 t de peso seco	Austrália, Israel, USA, China
<i>Aphanizomenon flos-aquae</i>	500 t de peso seco	USA
<i>Haematococcus pluvialis</i>	300 t de peso seco	USA, Índia, Israel
<i>Cryptocodinium cohnii</i>	240 t de óleo DHA	USA
<i>Shizochytrium</i>	10 t de óleo DHA	USA

Fonte: Spolaore, et al. (2006)

Actualmente, maior parte da biomassa microalgal produzida comercialmente está a ser comercializada como alimento saudável na forma de tabletes e cápsulas. As algas e os seus extractos encontram-se igualmente difundidos em massas, vinhos, bebidas, cereais de pequeno-almoço e cosméticos. Recentemente, as microalgas ganharam muita atenção devido ao seu elevado conteúdo nutricional, produtos químicos de alto valor (pigmentos e vitaminas), elevada taxa de crescimento (quando comparadas com plantas superiores) e a capacidade para utilizar energia da luz (Pulz e Gross 2004 e Priyadarshani e Rath 2012).

A *Chlorella* e a *Spirulina* dominam o mercado das microalgas. Durante as décadas passadas, a biomassa microalgal foi predominantemente utilizada no mercado de medicamentos naturais e nutracêuticos com mais de 75% da produção de biomassa anual a ser usada pelos fabricantes de pós, tabletes, cápsulas ou pastilhas. Inúmeras combinações de microalgas ou misturas com outros nutracêuticos podem ser encontrados no mercado dos fármacos naturais.

Comparado com pós de algas, os alimentos funcionais produzidos com biomassa microalgal são sensorialmente mais convenientes e variados. Assim combinam os benefícios para a saúde com a conveniência para o consumidor (Pulz e Gross 2004).

### 1.3.8. Regulamentação

A Tabela 10 apresenta uma lista de microalgas que actualmente são utilizadas em aplicações alimentares humanas e animais. A algumas destas microalgas foi atribuído o estatuto de GRAS (*Generally Recognized as Safe*) pela FDA (*Food and Drug Administration*) dos EUA (Enzing, et al. 2014).

**Tabela 10.** Microalgas relevantes para aplicações em alimentos/suplementos e os seus aspectos de segurança. GRAS, Generally Recognizes as Safe, NT, no toxins known.

Microalga (Divisão)	Espécies	Aspectos de segurança
Cianobactérias	<i>Spirulina / Arthrospira sp.</i>	GRAS
	<i>Synechococcus sp.</i>	NT
Chlorophyta	<i>Tetraselmis sp</i>	NT
	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	NT
	<i>Haematococcus pluvialis</i>	NT
	<i>Dunaliella sp.</i>	NT
	<i>Chlorococcum sp.</i>	NT
	<i>Scenedesmus</i>	NT
	<i>Desmodesmus sp</i>	NT
	<i>Chlorella sp</i>	GRAS
	<i>Parietochloris incisa</i>	NT
Rhodophyta	<i>Porphyridium cruentum</i>	GRAS
Heterokontophyta	<i>Navicula sp.</i>	NT
	<i>Nitzschia dissipata</i>	NT
	<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	NT
	<i>Thalassiosira pseudonana</i>	NT
	<i>Odontella aurita</i>	NT
	<i>Skeletonema sp.</i>	NT
	<i>Monodus subterraneus</i>	NT
	<i>Nannochloropsis sp.</i>	NT
Haptophyta	<i>Isochrysis sp.</i>	NT
	<i>Pavlova sp3</i>	NT
Dinophyta	<i>Cryptocodinium cohnii</i>	GRAS

Fonte: Enzing, et al. (2014)

Na Europa, a EFSA (*European Food Safety Authority*) é requisitada para avaliar a segurança de qualquer composto novo de alimentação humana e animal antes de serem autorizados para produção e comercialização. O painel científico da EFSA mantém uma lista de agentes biológicos para o qual pode ser aplicado o conceito de *Qualified Presumption of Safety* (QPS). A lista de QPS é revista e actualizada anualmente pela EFSA, embora as algas não estejam incluídas na lista de avaliação de QPS até ao momento (Enzing, et al. 2014).

O  $\beta$ -caroteno da *Dunaliella* e o DHA da *Cryptocodinium cohnii* já se encontram aprovados como ingredientes alimentares pela EFSA e a *Chlorella* e a *Spirulina* são geralmente vendidas como suplementos alimentares nos EUA e na Europa (Enzing, et al. 2014).

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1. MATERIAIS

A microalga *Chlorella vulgaris* foi fornecida pela empresa Allma e as suas especificações físicas e químicas encontram-se no ANEXO I. A microalga *Spirulina platensis* foi adquirida comercialmente e as suas especificações químicas encontram-se no ANEXO II.

Os restantes ingredientes utilizados para a preparação dos rebuçados foram isomalte, água, essências de spearmint/ manga / meloa / limão, aspartame e acessulfame k. Estes ingredientes foram os utilizados no processamento corrente dos rebuçados na Fábrica Lusiteca.

Os reagentes utilizados na realização dos ensaios químicos foram os de uso corrente analítico.

### 2.2. MÉTODOS

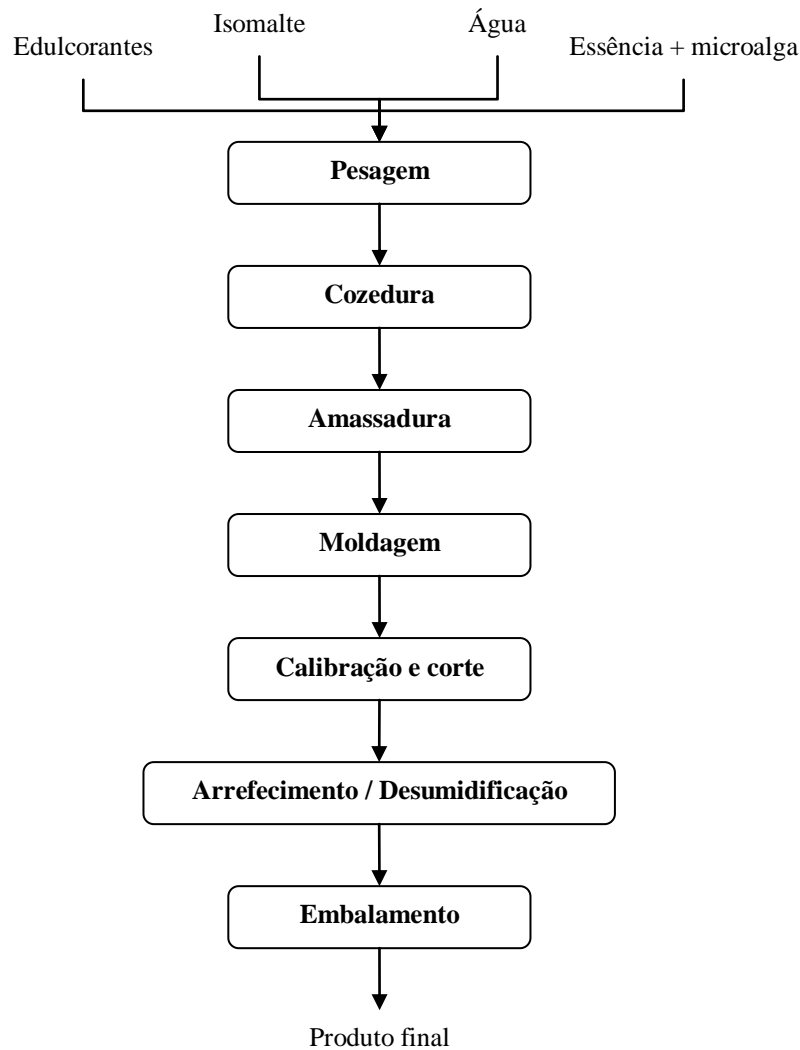
#### 2.2.1. Preparação do produto de confeitaria

No laboratório foram analisadas as especificações das microalgas e das essências a utilizar. Verificou-se a compatibilidade destes materiais já que se pretende que a essência funcione como veículo da microalga para ser mais simples a sua adição, em termos tecnológicos e operacionais.

O diagrama de produção representado na Figura 4 ilustra as diferentes etapas inerentes ao processo de fabrico do produto.

Numa primeira fase definiram-se três essências a utilizar: spearmint, manga e meloa. Para cada uma das três essências em estudo, incorporou-se a microalga *Chlorella vulgaris* nas concentrações (m/m) de 0,025%, 0,05%, 0,10%, 0,15% e 0,20%. Também foi preparado um produto controlo, apenas com a adição de cada essência, ou seja, 0,00% de microalga.

O rebuçado funcional foi produzido pela empresa de confeitaria, de acordo com as formulações já existentes, sendo a essência o veículo de incorporação da microalga. Esta decisão foi tomada com base na composição das essências, uma vez que estas continham teores apreciáveis de solventes orgânicos. Assim, a fração lipídica da microalga pôde ser emulsionada, obtendo-se uma mistura homogênea de essência/microalga.



**Figura 4.** Diagrama de produção do produto de confeitaria

O primeiro produto a ser produzido foi o resultante da combinação entre a essência de spearmint e a microalga *Chlorella vulgaris*. Após uma análise intermédia, decidiu-se não incorporar microalga nas concentrações (m/m) de 0,025% e 0,05% nas restantes essências devido à sua fraca coloração. Assim, os produtos preparados com as restantes essências, apenas foram elaborados com concentrações (m/m) de microalga de 0,00% (produto controlo), 0,10%, 0,15% e 0,20%.

Posteriormente, numa fase mais avançada, decidiu-se proceder à preparação do produto com recurso à utilização de uma alga diferente, *Spirulina platensis*. Simultaneamente à introdução desta microalga, também foi decidido elaborar o produto novamente com recurso a uma nova essência: limão. Com estes dois dados novos, foi tomada a decisão de elaborar um produto contendo essência de limão e incorporação de ambas as microalgas.

No seguimento destas alterações, também foi elaborado um produto com essência de spearmint, mas desta feita incorporou-se a microalga *Spirulina plantensis*. Assim, tornou-se possível efectuar uma comparação entre produtos elaborados com essências iguais, mas microalgas diferentes, concedendo maior riqueza ao estudo.

Em síntese, foram elaborados seis produtos com quatro essências diferentes. Duas dela (spearmint e limão) foram sujeitas à incorporação de ambas as microalgas (*Chlorella vulgaris* e *Spirulina platensis*) e as restantes essências (manga e meloa) apenas veicularam incorporação de *Chlorella vulgaris*.

### 2.2.2. Condições de conservação

Após preparado, o produto foi armazenado em 4 condições diferentes como mostra a Tabela 11.

**Tabela 11.** Características das quatro condições de conservação a que os produtos foram submetidos

Condições de conservação			
Código	Condições	Tempo de estudo	Observações
A	Temperatura ambiente; Ausência de luz (escuro);	10 Semanas	Conservação em caixa de cartão
B	Temperatura ambiente; Sob fonte luminosa (lâmpada) constante;	10 Semanas	<u>Características da lâmpada</u> Classe energética: A Potência: 11 W Fluxo luminoso: 600 lm Dimensões: 115 x 44 mm
C	Estufa a 55°C; Ausência de luz (escuro);	7 Dias	Ausência de ar circulante
D	Estufa a 30°C; Ausência de luz (escuro);	21 Dias	Ausência de ar circulante

Nos casos das condições de conservação A e B utilizaram-se frascos translúcidos com tampas opacas e nas condições C e D placas de Petri. Em todos os casos utilizaram-se 5 réplicas por cada frasco e placa de Petri.

### 2.2.3. Determinação instrumental da cor

A determinação da cor foi efectuada directamente sobre a superfície do produto, utilizando-se o colorímetro Minolta CR-300 (Japão), com o iluminante padrão D<sub>65</sub> e um ângulo visual de 2°.



Os resultados foram expressos de acordo com o sistema CIELab cujos parâmetros cromáticos são: *L*, luminosidade (valores entre 0 e 100), *a*, de vermelho a verde (valores positivos e negativos, +60 e -60 respectivamente) e *b*, de amarelo a azul (valores positivos a negativos, +60 e -60 respectivamente). As medições foram realizadas sob luz constante, à temperatura ambiente usando um padrão branco (*L* 97,21, *a* 0,13 e *b* 2,00) com recurso a 5 repetições por cada amostra.

As medições foram efetuadas ao longo do tempo para 4 condições diferentes de conservação já mencionadas anteriormente. No caso do produto sujeito às condições A e B analisou-se semanalmente desde a semana 0 até à semana 10. Em relação às condições C e D as análises decorreram conforme é indicado nas Tabela 12 e Tabela 13, respetivamente.

**Tabela 12.** Mapa de análises efetuadas relativamente aos parâmetros cromáticos durante a condição de conservação C (Estufa a 55°C; 7 dias)

<b>Essência / Microalga</b>	<b>Spearment / <i>S. platensis</i> Limão / <i>S. platensis</i> Limão / <i>C. vulgaris</i></b>	<b>Spearment / <i>C. vulgaris</i> Manga / <i>C. vulgaris</i></b>	<b>Meloa / <i>C. vulgaris</i></b>
<b>Dia</b>	0	0	0
	1	1	1
	2	2	2
	3	3	3
	4	4	-
	5	5	5
	6	-	6
	7	7	7

**Tabela 13.** Mapa de análises efetuadas relativamente aos parâmetros cromáticos durante a condição de conservação D (Estufa a 30°C; 21 dias)

<b>Essência / Microalga</b>	<b>Spearment / <i>S. platensis</i> Limão / <i>S. platensis</i> Limão / <i>C. vulgaris</i></b>	<b>Spearment / <i>C. vulgaris</i> Meloa / <i>C. vulgaris</i></b>	<b>Manga / <i>C. vulgaris</i></b>
<b>Dia</b>	0	0	0
	7	7	7
	-	13	-
	14	-	14
	-	15	-
	-	-	16
	17	17	17
	-	-	18
	19	19	19
	20	20	-
	21	21	21

#### 2.2.4. Caracterização físico-química

##### 2.2.4.1. Preparação das amostras

Em virtude do produto ser sólido, foi necessário parti-lo em partículas de dimensão reduzida de modo a adquirir condições propícias à sua análise.

##### 2.2.4.2. Determinação do teor de humidade

O método de referência utilizado para a determinação do teor de humidade foi o da AOAC (2000). As determinações foram efetuadas por gravimetria após secagem em estufa a  $105 \pm 5^\circ\text{C}$  durante, aproximadamente 10 a 12 horas, seguido de um arrefecimento em exsiccador por 30 minutos. A quantidade de amostra analisada foi de aproximadamente 2,000 g pesada na balança analítica KERN 870. A percentagem de humidade na amostra foi calculada através da seguinte equação:

$$\% \text{ Humidade} = \frac{\text{massa de amostra húmida} - \text{massa de amostra seca}}{\text{massa de amostra húmida}} \times 100$$

As determinações foram realizadas em triplicado, no início e no fim de cada uma das condições de conservação.

##### 2.2.4.3. Determinação da atividade da água

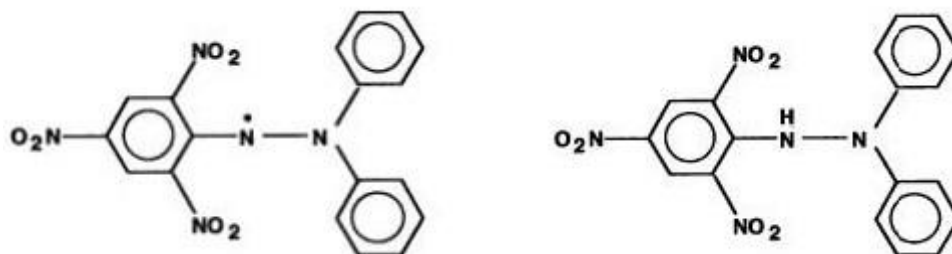
A determinação da atividade da água foi efetuada em triplicado, utilizando o HygroLab 3 (Rotronic) a temperatura constante de  $20 \pm 1^\circ\text{C}$ . As determinações foram realizadas no início e no fim de cada uma das condições de conservação.

##### 2.2.4.4. Determinação da atividade antioxidante

###### Princípio do método do DPPH

A molécula de 1,1-difenil-2-picrilhidrazil é caracterizada como um radical livre estável devido à deslocalização do electrão livre sobre a molécula como um todo. Assim, permite que a molécula não dimerize, como é o caso da maioria dos radicais livres. A deslocalização também confere um aumento de cor violeta forte, caracterizada por uma banda de absorção na solução de etanol centrada no comprimento de onda dos 520 nm no espectrofotómetro. Quando uma solução de DPPH é misturada com uma substância que possa doar um átomo de hidrogénio, leva à forma

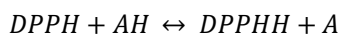
reduzida (Figura 5) com a perda desta cor violeta, embora seja expectável ser uma cor amarela clara do grupo picril ainda presente (Molyneux 2004).



**Figura 5.** Formas reduzidas (à direita) e livres (à esquerda) do picrilhidrazil (DPPH)

**Fonte:** Molyneux (2004)

Assim, o DPPHH é um produto da reação entre o DPPH e um antioxidante (AH) como demonstra a equação que se segue:



A reversibilidade da reação é avaliada pela adição de DPPHH no final da reação. Se houver um aumento na percentagem de DPPH restante neste patamar, a reação é reversível. Caso contrário é uma reação completa (Bondet, Brand-Williams e Berset 1997).

### **Metodologia utilizada**

A determinação da atividade antioxidante foi efetuada de acordo com o método original de Brand-Williams, Cuveliet e Berset (1995) com as modificações propostas por Thaipong, *et al.* (2006).

Para a preparação das amostras, transferiu-se 4 mL da solução de trabalho para frascos âmbar e de seguida adicionou-se 150 µL de amostra em cada frasco e agitou-se ligeiramente. Seguidamente, os frascos foram colocados no escuro, à temperatura ambiente, durante 40 minutos. As amostras foram realizadas em triplicado, sendo que foram diluídas previamente em água desionizada numa proporção de 1 para 5.

As leituras das absorvâncias foram efetuadas a 517 nm. Uma absorvância mais baixa da mistura da reação indica maior atividade de sequestração de radicais livres. A capacidade para sequestrar o radical DPPH foi calculada recorrendo ao cálculo do RSA (*Radical Scavenging Activity*) como se verifica na seguinte equação:

$$\text{Sequestração de DPPH (\%)} = \frac{A_{\text{controle}} - A_{\text{amostra}}}{A_{\text{controle}}} \times 100$$

Onde  $A_{\text{controle}}$  é a absorvância da reação de controle e  $A_{\text{amostra}}$  é a absorvância na presença de amostra. Assim, quanto maior for a percentagem de sequestração de DPPH, maior será a atividade antioxidante dos produtos em análise.

### 2.2.5. Análise sensorial

A análise sensorial foi efetuada utilizando a ficha de prova apresentada no ANEXO III. Foram testadas a presença de determinados atributos e ainda parâmetros de carácter hedónico, como a avaliação global e a intenção de compra dos produtos.

Para a realização desta análise recorreu-se a um painel 30 provadores não treinados, embora familiarizados com o tipo de provas propostas, cujas idades se encontram compreendidas entre os 21 e os 58 anos.

### 2.2.6. Análise estatística

Para determinar a existência de diferenças significativas entre valores médios, recorreu-se à Análise de Variância (ANOVA) com recurso aos testes de Tukey, com 95% de confiança.

O tratamento de resultados foi elaborado pelo *software* Microsoft Office Excel 2007 e pelo *software* Action.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

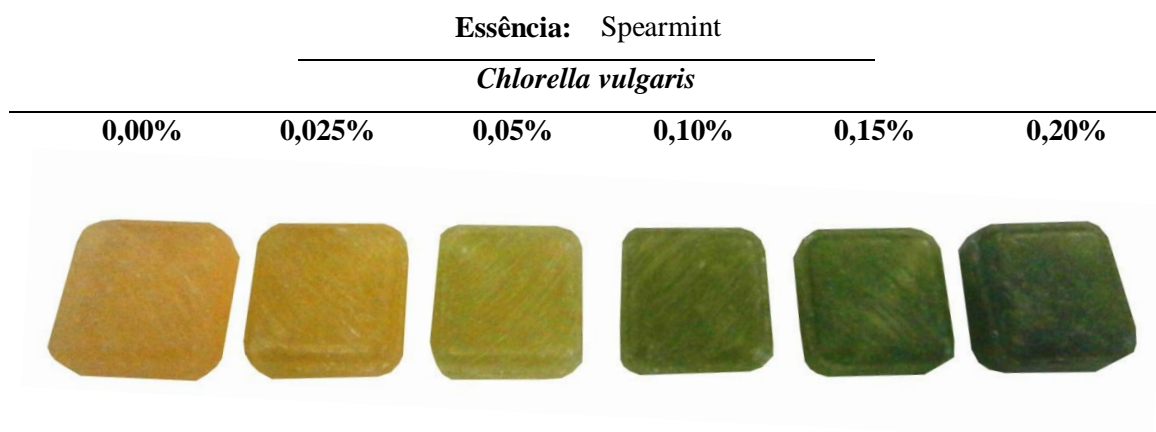
#### 3.1. AVALIAÇÃO DA COR

Os resultados obtidos para a avaliação instrumental da cor têm várias abordagens possíveis que irão ser analisadas. A **Abordagem 1** irá analisar a existência, ou não, de diferenças nos parâmetros *L*, *a* e *b* entre as várias concentrações de microalga contidas nos produtos, sob as quatro condições de conservação, e perceber se estas condições de conservação são responsáveis pelas discrepâncias de resultados.

Na **Abordagem 2** será dado destaque a uma análise que, embora não possua valor estatístico, informa acerca do *just noticeable difference* (JND), ou seja, a diferença perceptível sensorialmente. Em primeiro lugar irá ser analisada a influência das condições de conservação e, na **Abordagem 3**, será efetuada uma breve análise aos produtos com diferentes concentrações de microalga.

#### Abordagem 1

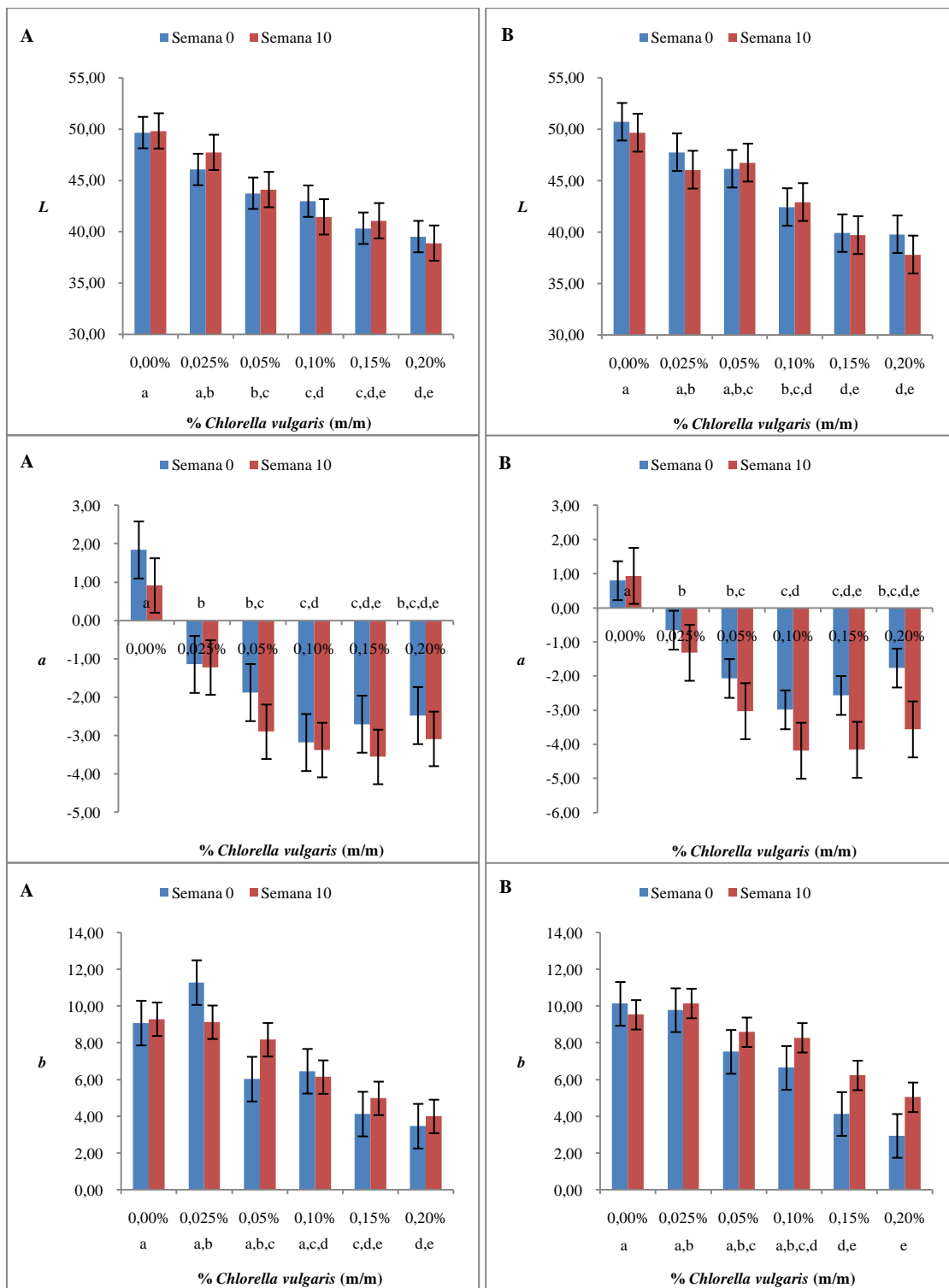
A partir da Figura 6 é possível visualizar os produtos obtidos com essência de spearmint e a microalga *Chlorella vulgaris*.



**Figura 6.** Produtos obtidos a partir da essência de spearmint e a microalga *Chlorella vulgaris*

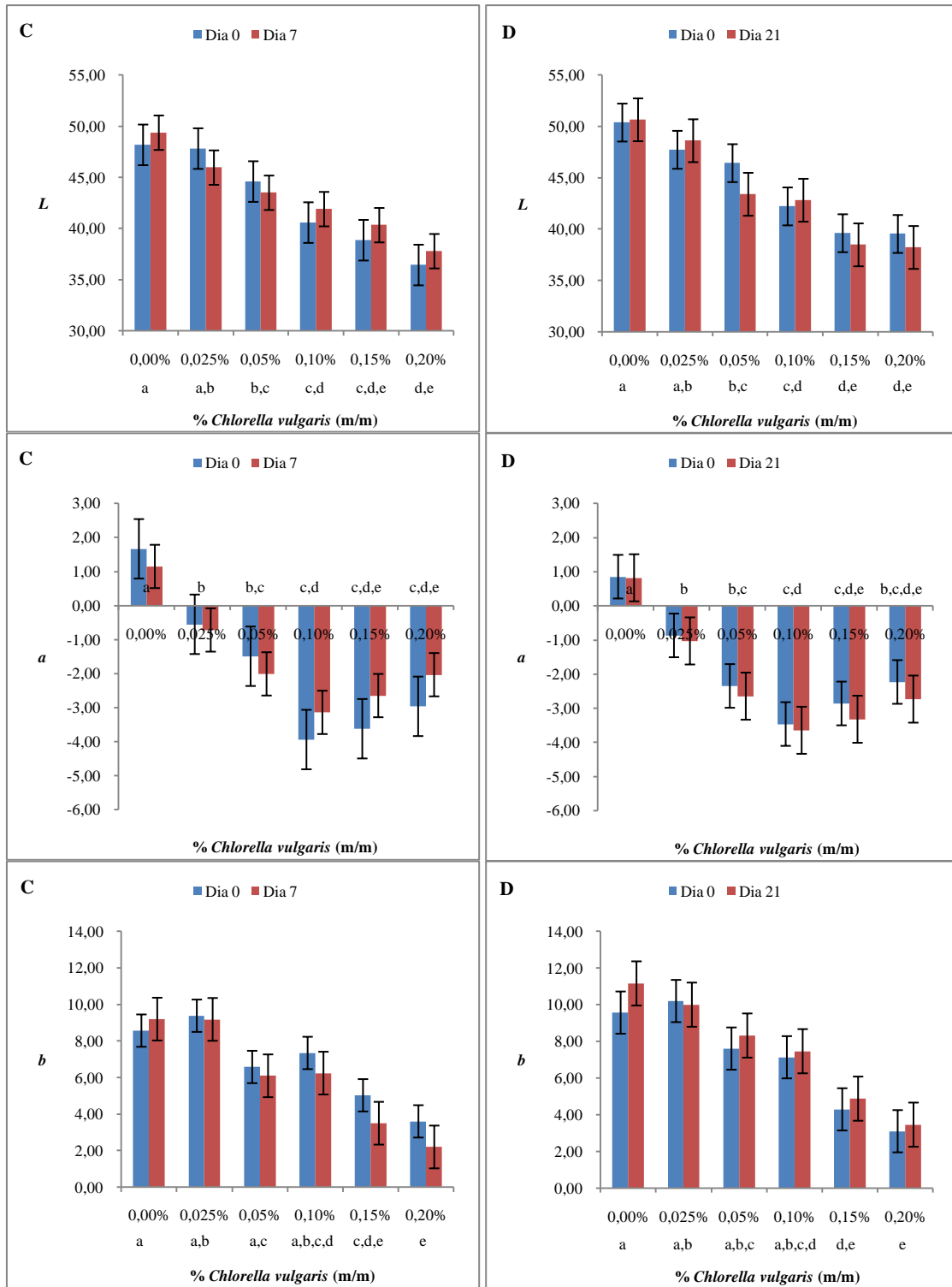
As Figuras Figura 7 e Figura 8 mostram os resultados obtidos para os produtos acima referidos. Desde logo é de salientar que, independentemente da concentração de *Chlorella vulgaris*, os valores iniciais e finais de cada condição de conservação não apresentaram qualquer diferença

significativa. Ou seja, não há diferenças significativas na cor ao longo das primeiras 10 semanas. Este é um bom indicador de estabilidade do produto.



**Figura 7.** Parâmetros cromáticos (*L*, *a* e *b*) dos reboçados com essência de spearmint, contendo diferentes concentrações de biomassa de *Chlorella vulgaris*, no início e fim das condições de conservação A (Escuro; 10 semanas) e B (Luz constante; 10 semanas)

Letras minúsculas diferentes correspondem a produtos com concentrações de microalga significativamente diferentes



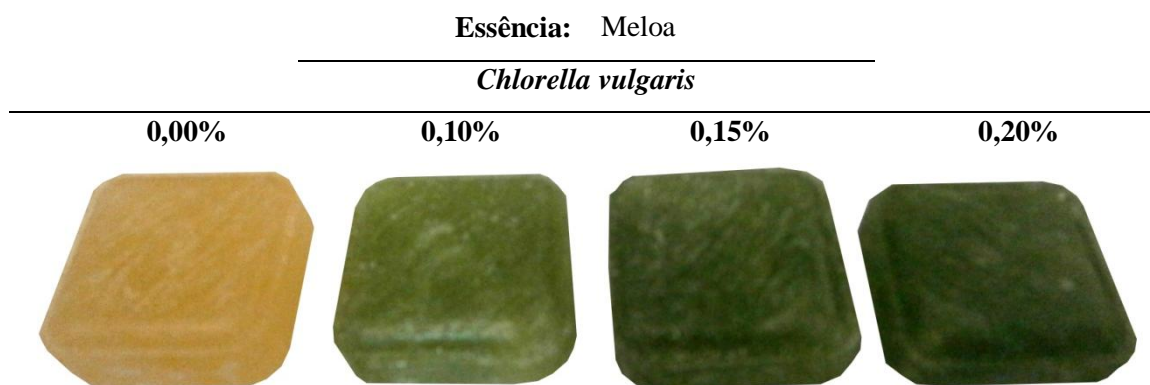
**Figura 8.** Parâmetros cromáticos ( $L$ ,  $a$  e  $b$ ) dos reбуçados com essência de spearmint, contendo diferentes concentrações de biomassa de *Chlorella vulgaris*, no início e fim das condições de conservação C (Estufa a 55°C; 7 dias) e D (Estufa a 30°C; 21 dias)

Letras minúsculas diferentes correspondem a produtos com concentrações de microalga significativamente diferentes

Por outro lado, é de salientar a diferença na cor dos rebuçados com microalga e o rebuçado controlo. Há um escurecimento, dado pela redução de luminosidade  $L$ , praticamente proporcional à concentração de microalga adicionada. No valor de  $b$ , a influência da adição de microalga só é detectada a partir de 0,05% e reduz o valor de forma proporcional à quantidade de microalga, ficando cada vez com menos amarelo. É no parâmetro  $a$ , vermelho a verde, que o efeito é mais pronunciado. O rebuçado controlo está na zona positiva e logo na primeira concentração passa para a zona negativa, o verde. Mais, o tipo de variação não é proporcional como no caso do  $L$  e do  $b$ , mas sim assintótico: intensifica o verde até 0,10% e depois estabiliza para adições crescentes de microalga. Em termos de cor verde, não aumentamos o seu valor adicionando mais microalga, embora se torne mais escuro e menos amarelo.

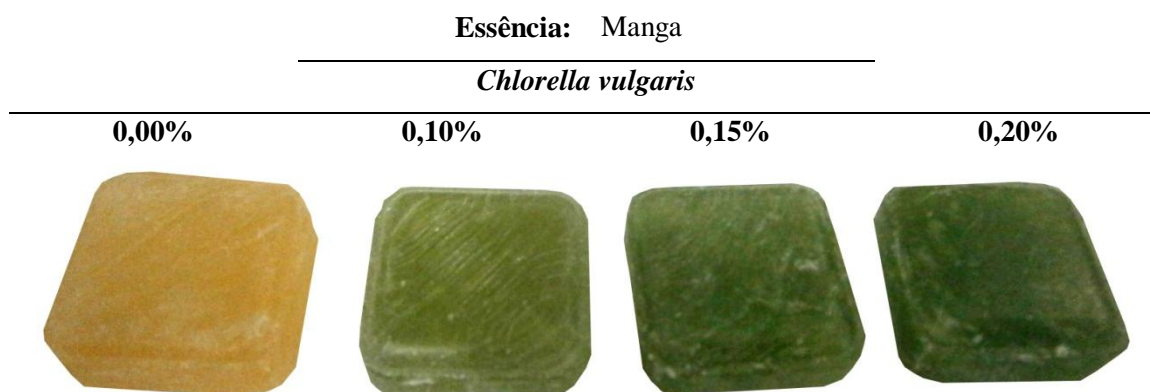
As condições de conservação não afectam significativamente as diferenças existentes entre as várias concentrações de *Chlorella vulgaris*. Este dado deriva do facto dos parâmetros  $L$ ,  $a$  e  $b$  apresentarem, cada um, as suas diferenças que são sempre muito semelhantes nas 4 condições de conservação. Por último, mas não menos importante, é de reforçar o facto de que o comportamento do produto controlo e os produtos contendo *Chlorella vulgaris* apresentam comportamentos semelhantes.

As Figura 9 e Figura 10 e mostram os produtos obtidos com a microalga *Chlorella vulgaris* e as essências de meloa e manga, respetivamente.



**Figura 9.** Produtos obtidos a partir da essência de meloa e a microalga *Chlorella vulgaris*



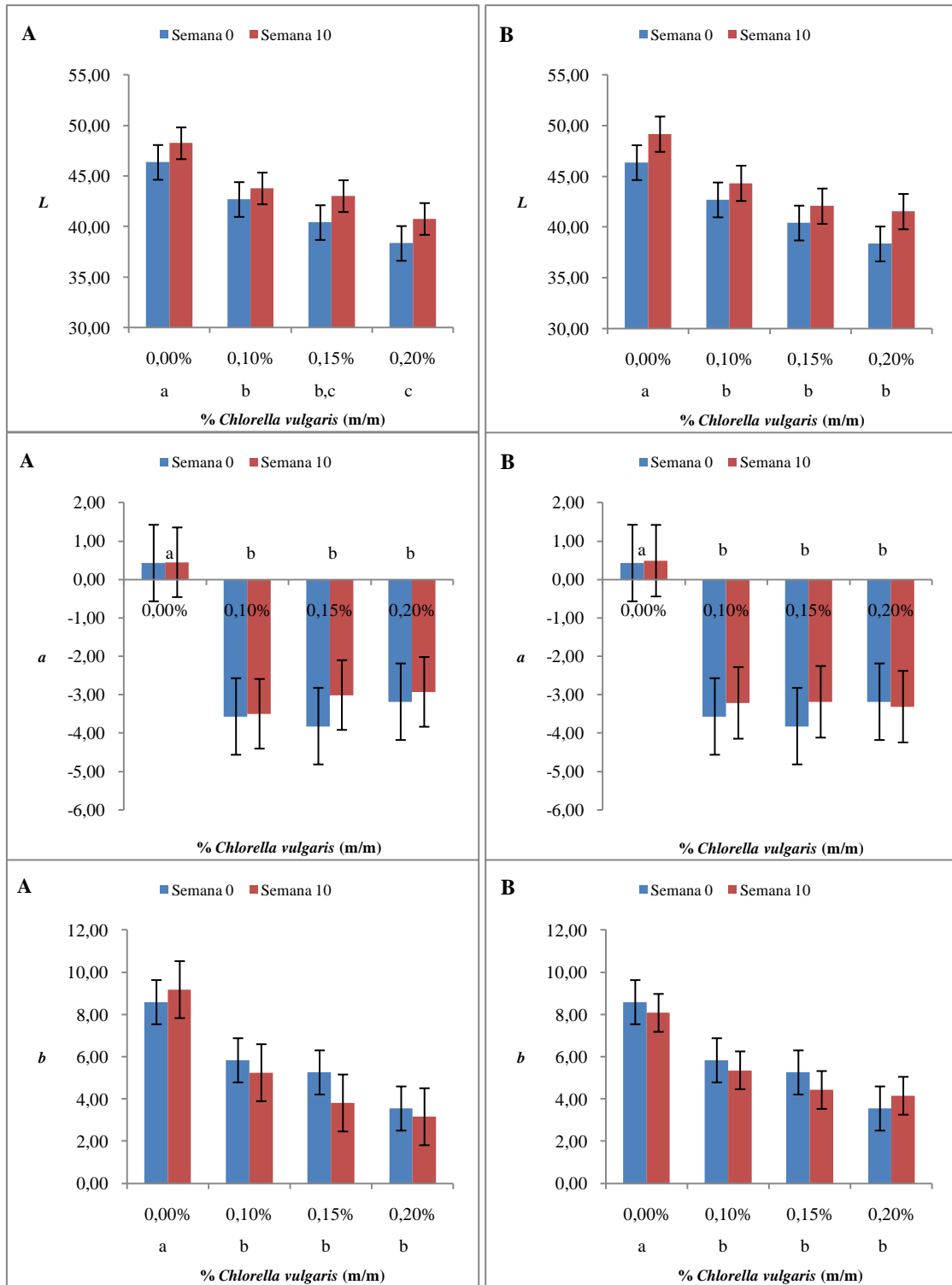


**Figura 10.** Produtos obtidos a partir da essência de manga e a microalga *Chlorella vulgaris*

Ambos os produtos foram os que apresentaram maior semelhança de resultados. Quer com a essência de meloa (Figura 11 e Figura 12) quer com essência de manga (Figura 13 e Figura 14) acabaram por revelar que, independentemente do parâmetro cromático, o produto controlo é sempre diferente dos produtos contendo *Chlorella vulgaris*. No entanto, não existem diferenças significativas entre os produtos com diferentes concentrações de *Chlorella vulgaris*. Ou seja, embora haja uma concentração crescente de microalga, esta parece não afectar os resultados do ponto de vista estatístico.

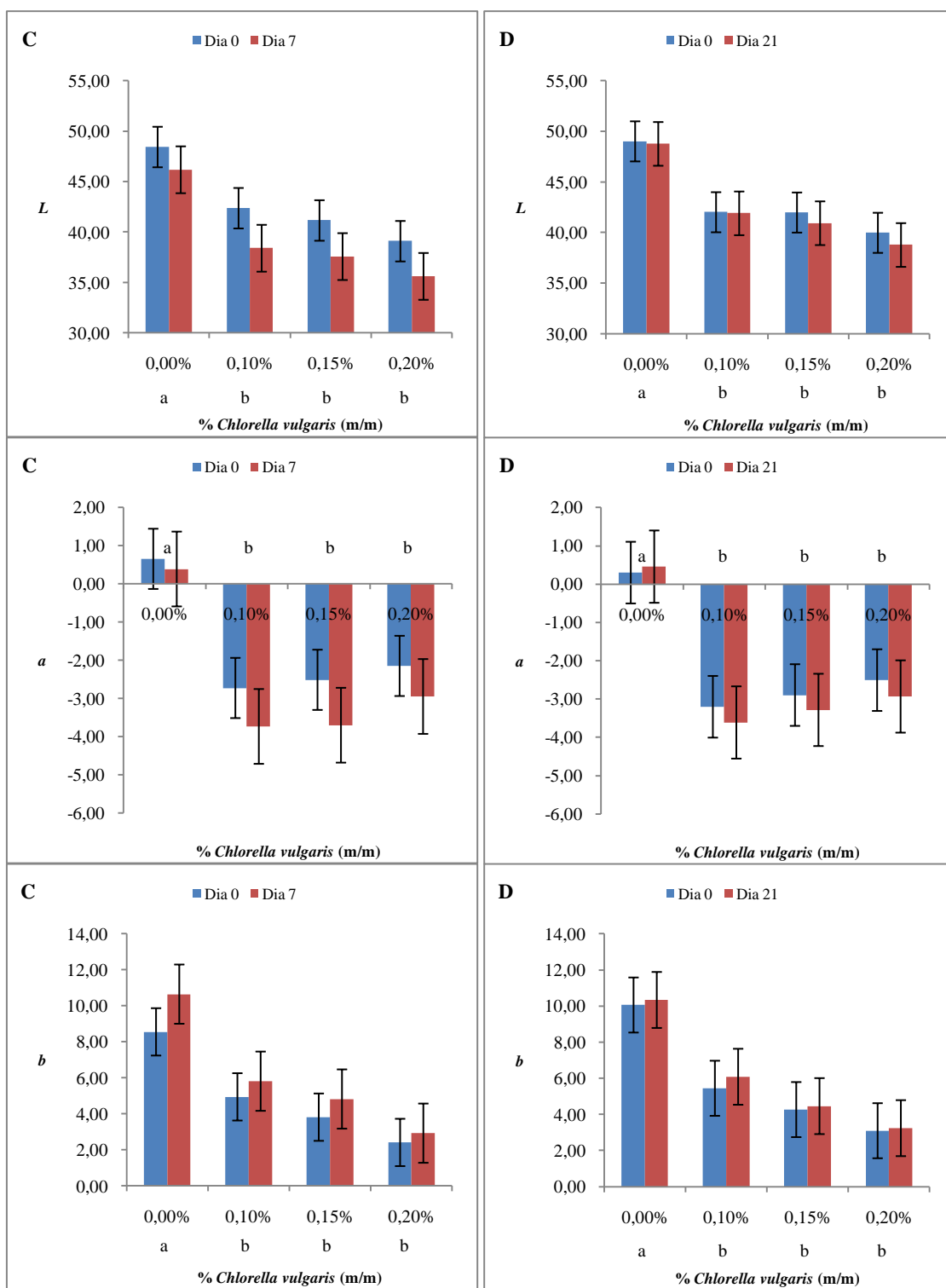
No caso da luminosidade, destaca-se a tendência para uma variação praticamente proporcional à concentração de microalga em todos os casos, a comprovar os primeiros resultados das Figura 7 e Figura 8.

Nestes dois produtos contendo as essências de meloa e manga, mais uma vez se constata a estabilidade da cor do produto nas condições testadas.



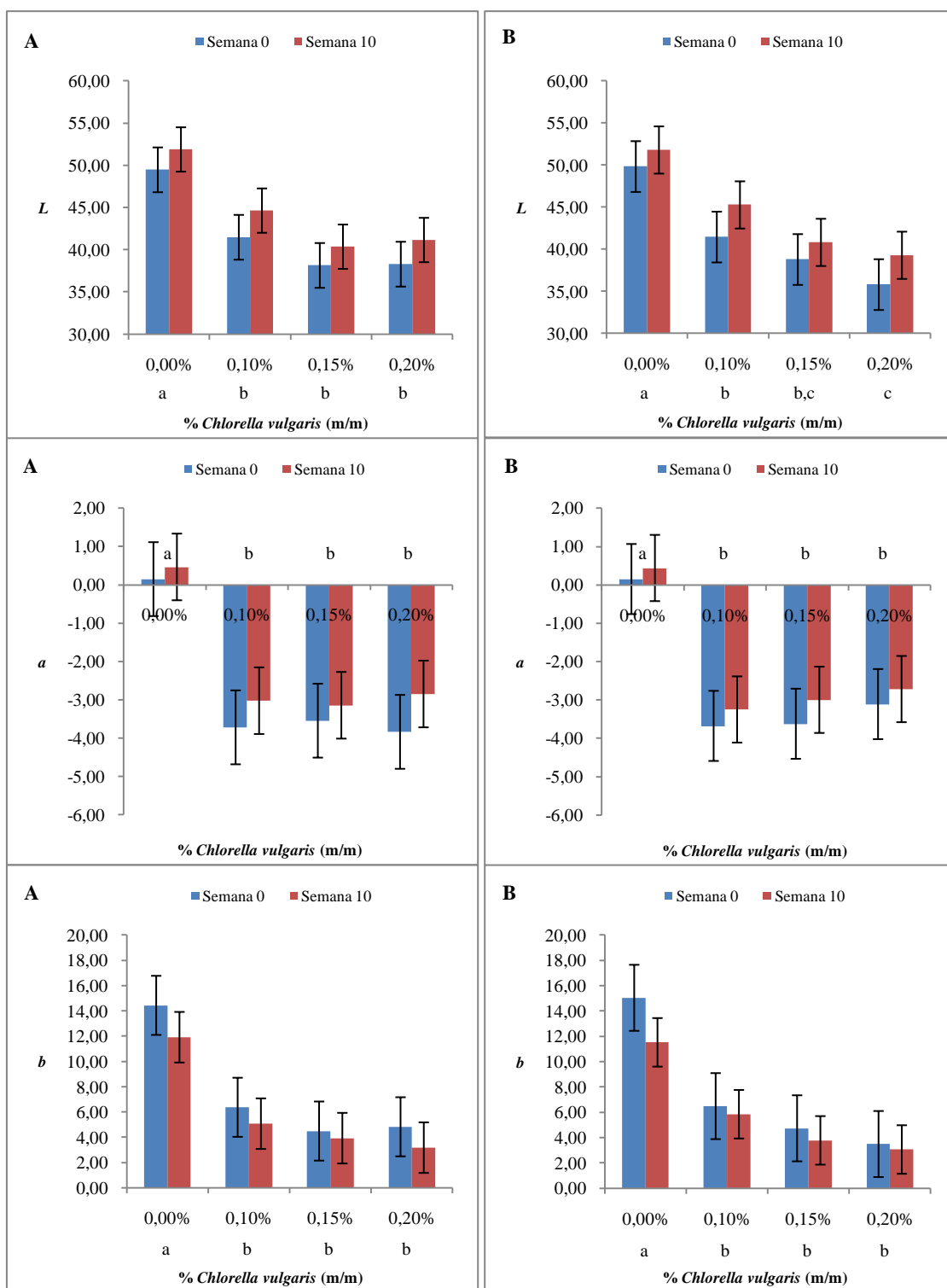
**Figura 11.** Parâmetros cromáticos (*L*, *a* e *b*) dos reboçados com essência de meloa, contendo diferentes concentrações de biomassa de *Chlorella vulgaris*, no início e fim das condições de conservação A (Escuro; 10 semanas) e B (Luz constante; 10 semanas)

Letras minúsculas diferentes correspondem a produtos com concentrações de microalga significativamente diferentes



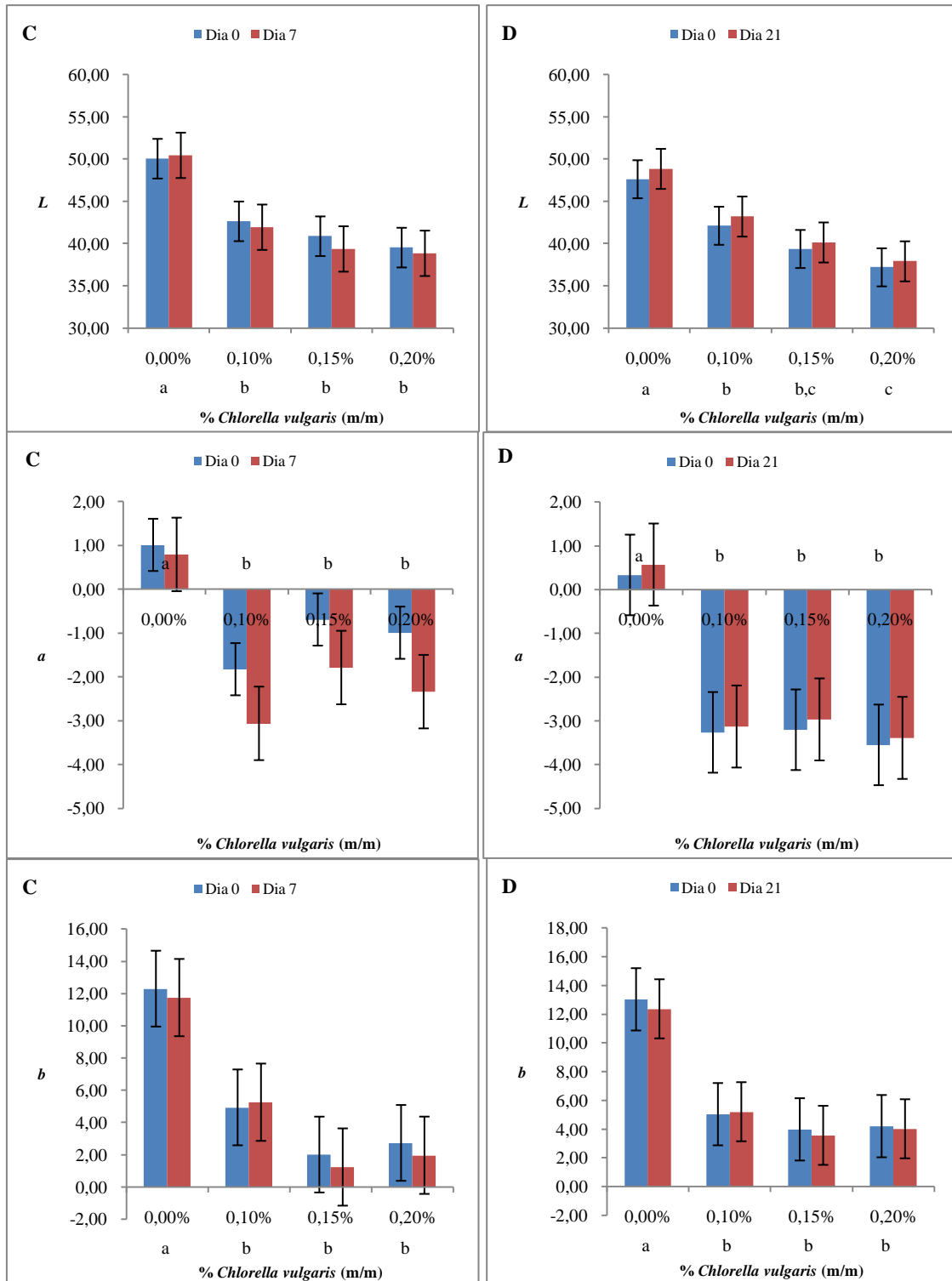
**Figura 12.** Parâmetros cromáticos (*L*, *a* e *b*) dos reboçados com essência de meloa, contendo diferentes concentrações de biomassa de *Chlorella vulgaris*, no início e fim das condições de conservação C (Estufa a 55°C; 7 dias) e D (Estufa a 30°C; 21 dias)

Letras minúsculas diferentes correspondem a produtos com concentrações de microalga significativamente diferentes



**Figura 13.** Parâmetros cromáticos ( $L$ ,  $a$  e  $b$ ) dos reбузados com essência de manga, contendo diferentes concentrações de biomassa de *Chlorella vulgaris*, no início e fim das condições de conservação A (Escuro; 10 semanas) e B (Luz constante; 10 semanas)

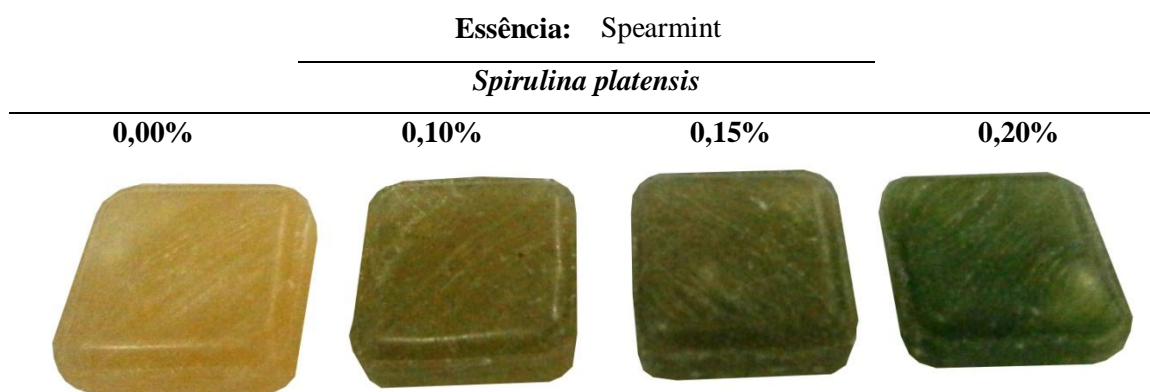
Letras minúsculas diferentes correspondem a produtos com concentrações de microalga significativamente diferentes



**Figura 14.** Parâmetros cromáticos (*L*, *a* e *b*) dos rebuçados com essência de manga, contendo diferentes concentrações de biomassa de *Chlorella vulgaris*, no início e fim das condições de conservação C (Estufa a 55°C; 7 dias) e D (Estufa a 30°C; 21 dias)

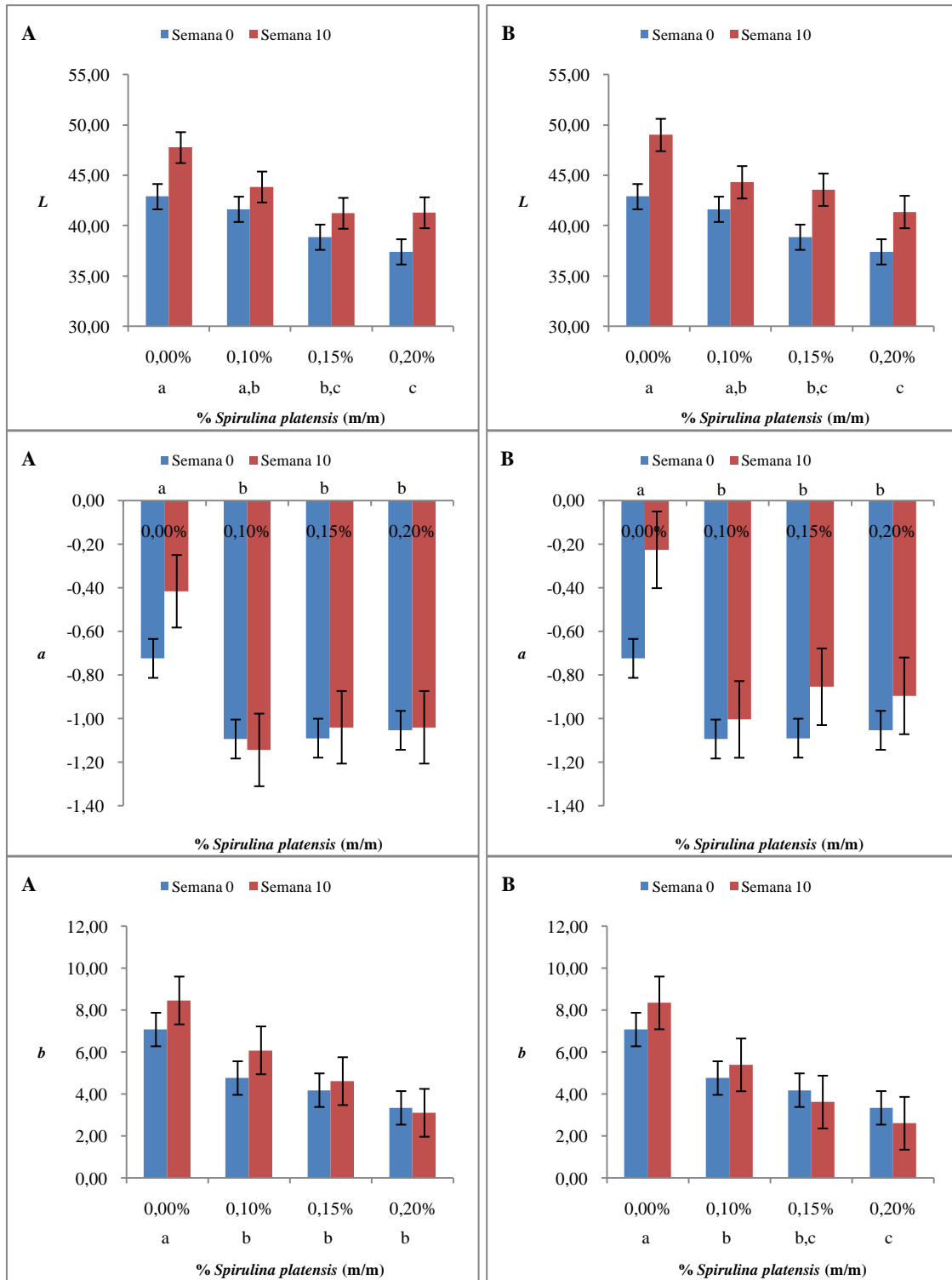
Letras minúsculas diferentes correspondem a produtos com concentrações de microalga significativamente diferentes

A Figura 15 ilustra os produtos obtidos a partir da essência de spearmint e da microalga *Spirulina platensis*.



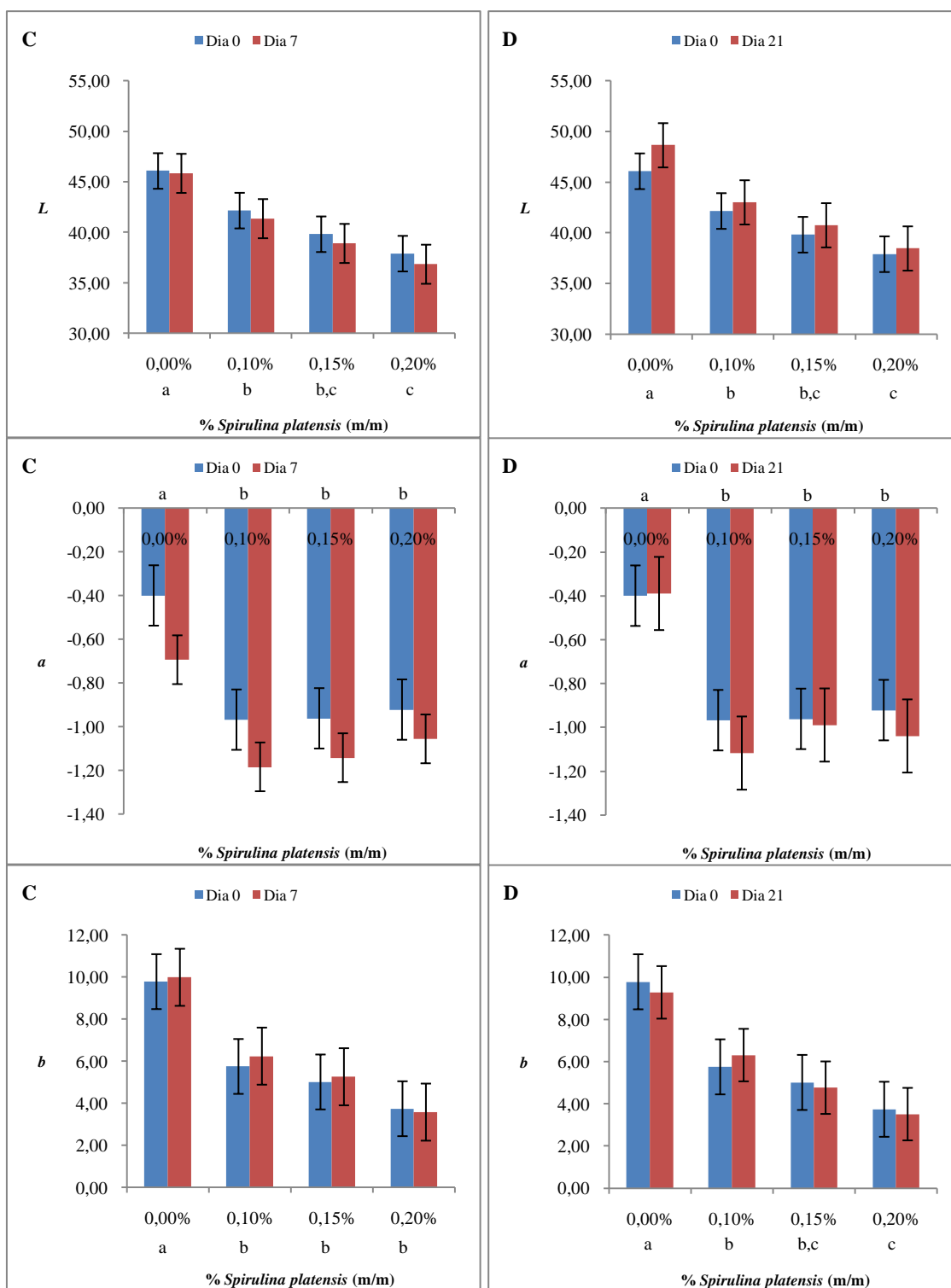
**Figura 15.** Produtos obtidos a partir da essência de spearmint e a microalga *Spirulina platensis*

Relativamente a estes produtos pode-se constatar que foram os únicos a apresentar alguma instabilidade durante as condições de conservação. Como é visível nas Figura 16 e Figura 17, o parâmetro cromático afetado significativamente por esta instabilidade foi a luminosidade *L*. A condição de conservação B, sob luz constante, é onde se torna mais notório um aumento ligeiro, mas significativo, da luminosidade, indicando um desvanecimento ligeiro na cor.



**Figura 16.** Parâmetros cromáticos ( $L$ ,  $a$  e  $b$ ) dos reboçados com essência de spearmint, contendo diferentes concentrações de biomassa de *Spirulina platensis*, no início e fim das condições de conservação A (Escuro; 10 semanas) e B (Luz constante; 10 semanas)

Letras minúsculas diferentes correspondem a produtos com concentrações de microalga significativamente diferentes



**Figura 17.** Parâmetros cromáticos ( $L$ ,  $a$  e  $b$ ) dos rebaudos com essência de spearmint, contendo diferentes concentrações de biomassa de *Spirulina platensis*, no início e fim das condições de conservação C (Estufa a 55°C; 7 dias) e D (Estufa a 30°C; 21 dias)

Letras minúsculas diferentes correspondem a produtos com concentrações de microalga significativamente diferentes



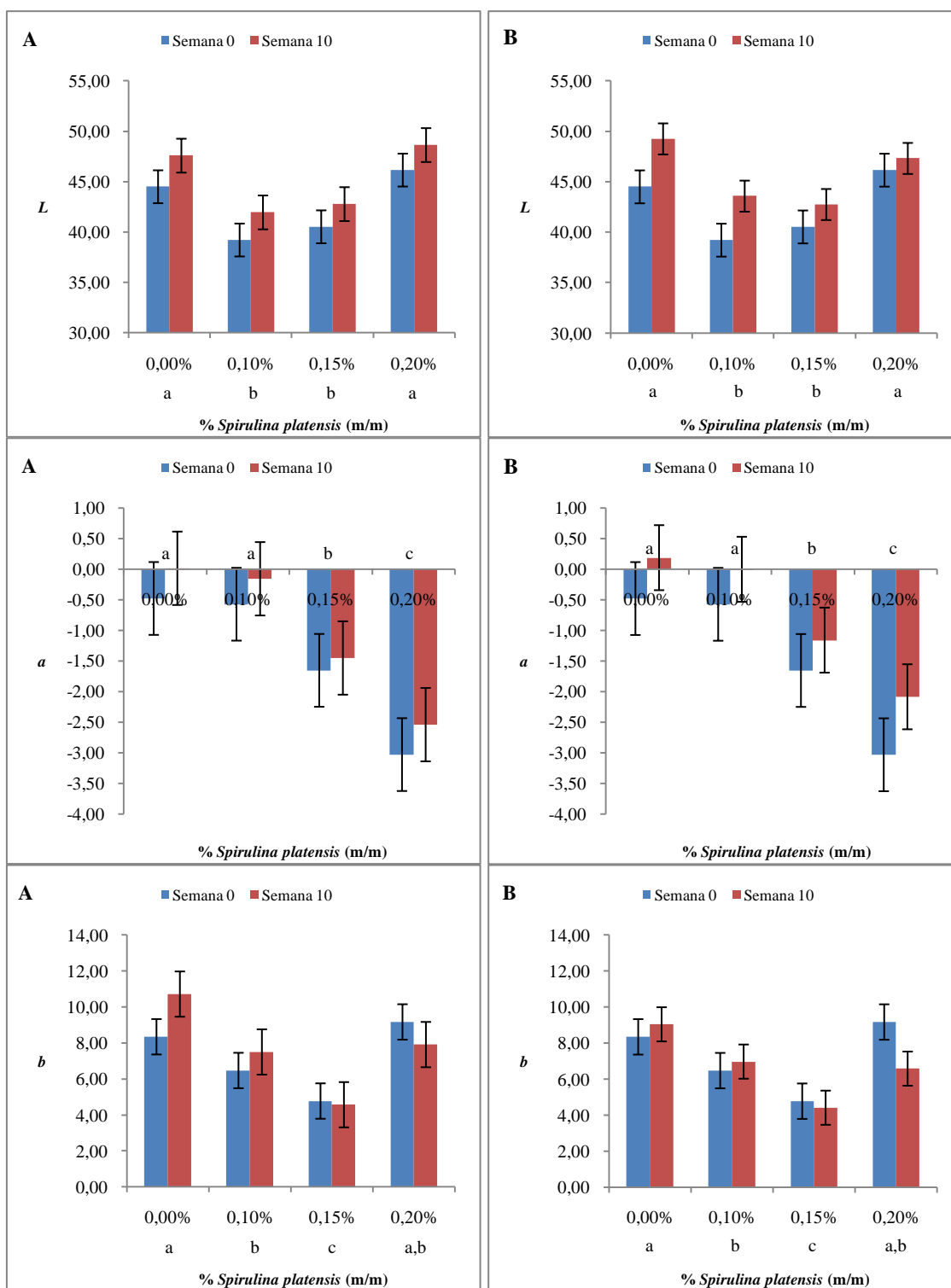
A Figura 18 mostra os produtos obtidos com essência de limão e a microalga *Spirulina platensis*.



**Figura 18.** Produtos obtidos a partir da essência de limão e a microalga *Spirulina platensis*

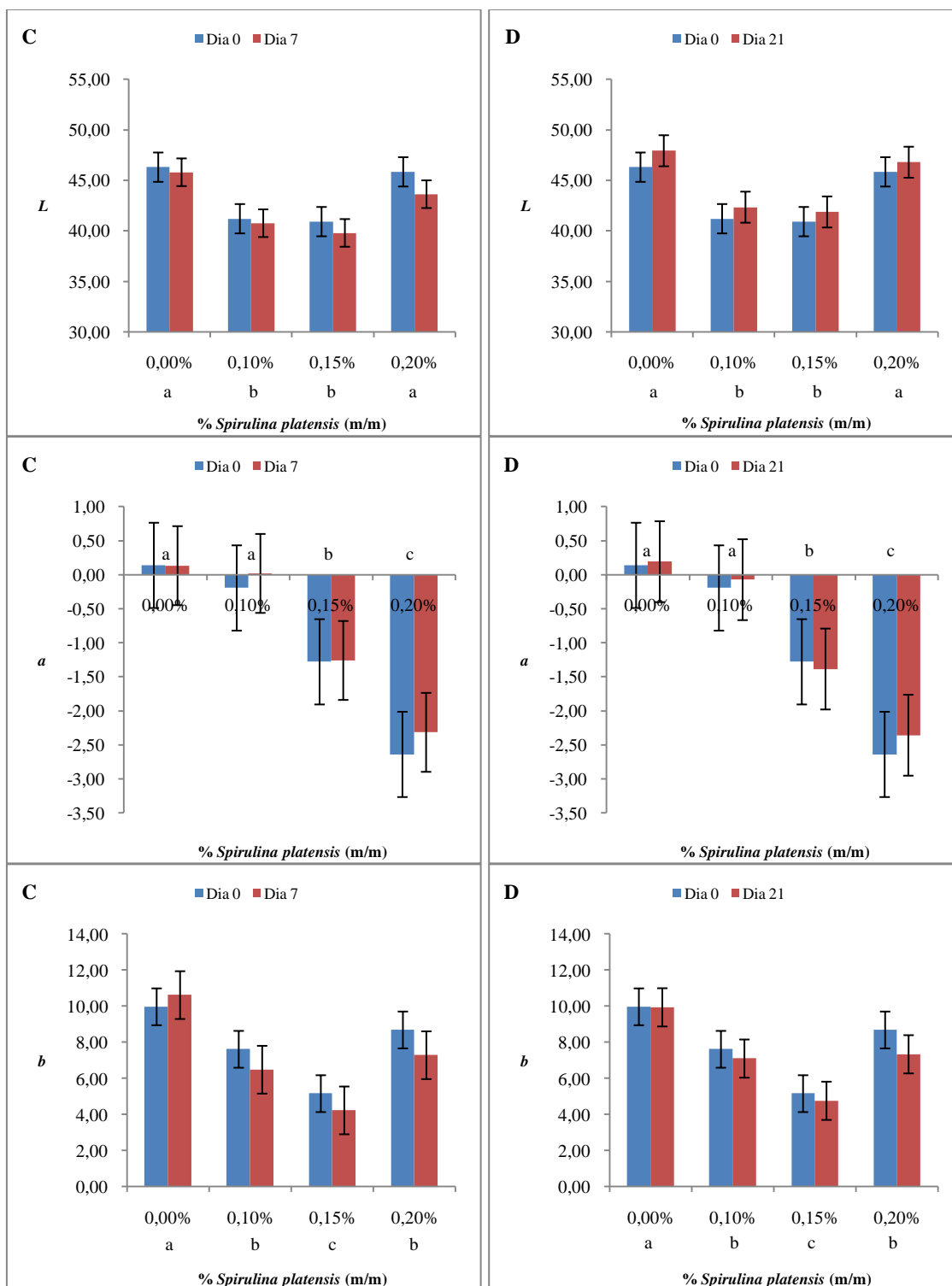
Analogamente aos produtos analisados anteriormente, estes vêm reforçar a noção de estabilidade e consistência existente entre as várias concentrações de microalga nos parâmetros cromáticos, como demonstram as Figura 19 e Figura 20.

Paralelamente ao que havia sucedido aos produtos com essência de spearmint e a microalga *Spirulina platensis*, o parâmetro cromático *L* voltou a ser o único afectado pelas condições de conservação. Neste caso houve diferenças significativas nas condições de conservação A (temperatura ambiente e no escuro) e B (temperatura ambiente sob luz constante), com um ligeiro, mas significativo, desvanecimento de cor na concentração mais baixa.



**Figura 19.** Parâmetros cromáticos ( $L$ ,  $a$  e  $b$ ) dos rebuçados com essência de limão, contendo diferentes concentrações de biomassa de *Spirulina platensis*, no início e fim das condições de conservação A (Escuro; 10 semanas) e B (Luz constante; 10 semanas)

Letras minúsculas diferentes correspondem a produtos com concentrações de microalga significativamente diferentes



**Figura 20.** Parâmetros cromáticos (*L*, *a* e *b*) dos rebuçados com essência de limão, contendo diferentes concentrações de biomassa de *Spirulina platensis*, no início e fim das condições de conservação C (Estufa a 55°C; 7 dias) e D (Estufa a 30°C; 21 dias)

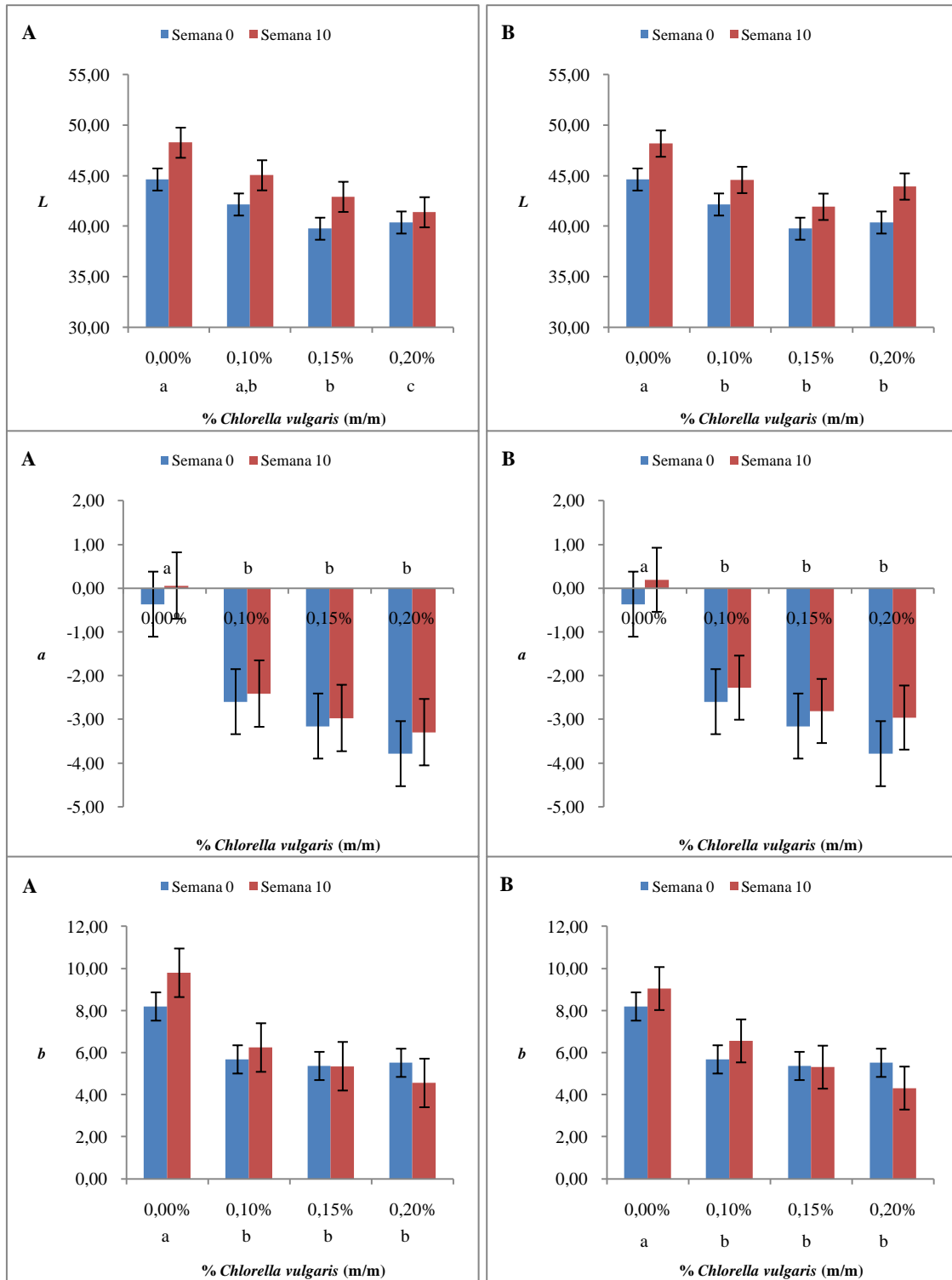
Letras minúsculas diferentes correspondem a produtos com concentrações de microalga significativamente diferentes

Por último, os produtos obtidos a partir da essência de limão e da microalga *Chlorella vulgaris* encontram-se representados na Figura 21.



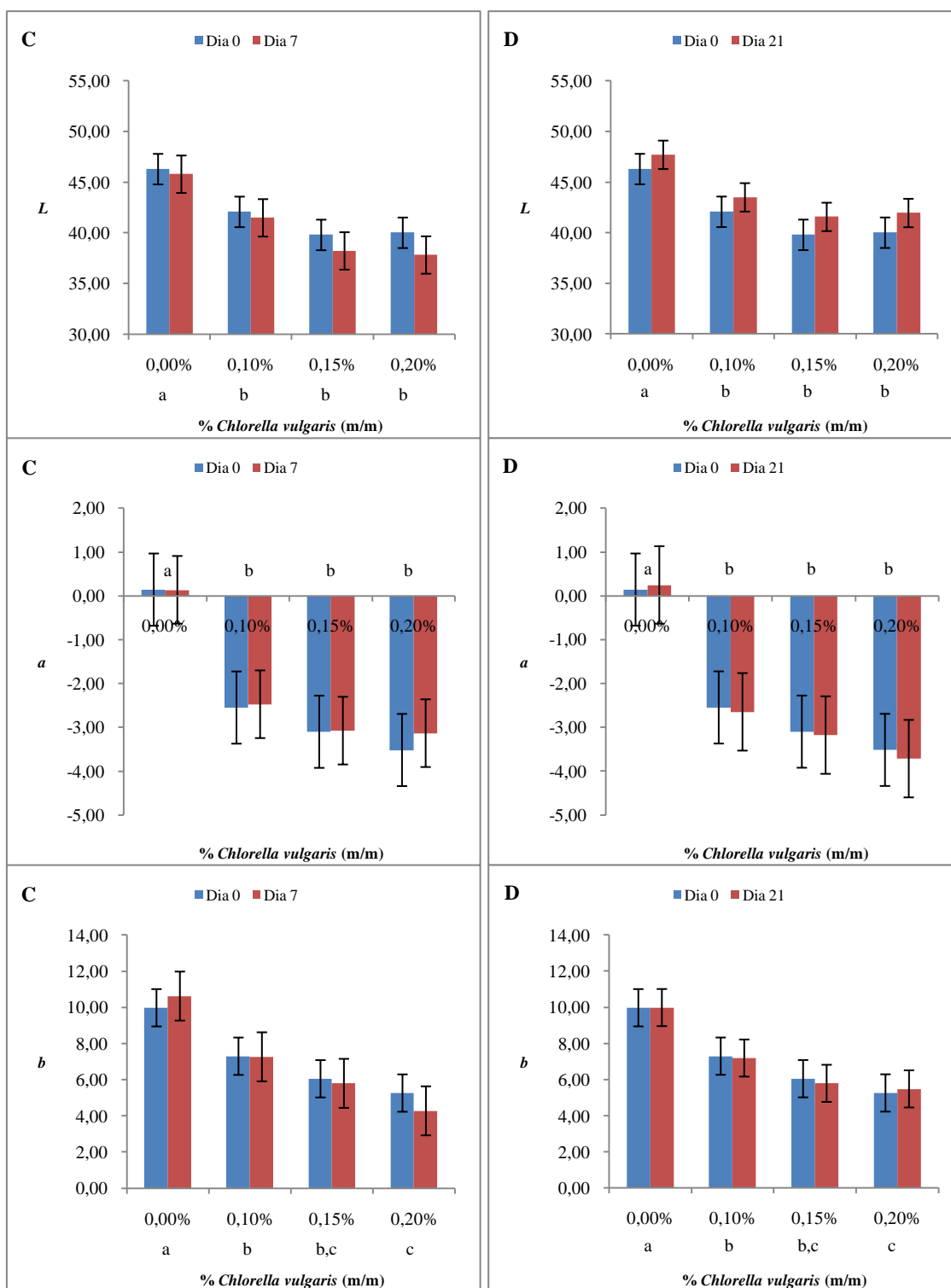
**Figura 21.** Produtos obtidos a partir da essência de limão e a microalga *Chlorella vulgaris*

Os produtos obtidos através desta combinação apresentam um perfil de resultados (Figura 22 e Figura 23) bastante semelhante àqueles exibidos com as essências de manga e meloa. Nomeadamente no comportamento idêntico que o parâmetro cromático *L* tem nas condições de conservação A e B e que resulta em valores significativamente diferentes no início e fim das ditas condições de conservação.



**Figura 22.** Parâmetros cromáticos ( $L$ ,  $a$  e  $b$ ) dos rebuçados com essência de limão, contendo diferentes concentrações de biomassa de *Chlorella vulgaris*, no início e fim das condições de conservação A (Escuro; 10 semanas) e B (Luz constante; 10 semanas)

Letras minúsculas diferentes correspondem a produtos com concentrações de microalga significativamente diferentes



**Figura 23.** Parâmetros cromáticos ( $L$ ,  $a$  e  $b$ ) dos rebuçados com essência de limão, contendo diferentes concentrações de biomassa de *Chlorella vulgaris*, no início e fim das condições de conservação C (Estufa a 55°C; 7 dias) e D (Estufa a 30°C; 21 dias)

Letras minúsculas diferentes correspondem a produtos com concentrações de microalga significativamente diferentes

Em suma, todos os resultados obtidos revelam um padrão de comportamento característico. Todos os parâmetros cromáticos ( $L$ ,  $a$  e  $b$ ) registam um decréscimo de valor com a adição de microalga, corroborando os resultados obtidos por Gouveia, *et al.* (2005) e Gouveia, *et al.* (2007). No entanto, fica provado estatisticamente que, no geral, não existem diferenças significativas entre produtos com diferentes concentrações (m/m) de microalga, embora exista uma tendência generalizada de escurecimento (luminosidade  $L$ ) proporcional à concentração de microalga.

O parâmetro  $a$  indica que existe uma tendência de aumento da cor verde. Os parâmetros  $L$  e  $b$  mostram um escurecimento e perda de tonalidade amarela dos produtos, respetivamente.

A única situação em que este cenário não é abrangido é quando se trata dos produtos com essência de limão / *Spirulina platensis*. Este é um caso em que se verifica que aumenta a luminosidade  $L$  com a concentração de *Spirulina platensis* e o parâmetro  $b$  tem uma variação parabólica com um mínimo numa concentração intermédia de microalga. No entanto, o produto elaborado com a mesma essência, mas com *Chlorella vulgaris*, apresenta-se de acordo com o cenário geral já acima descrito. Este aumento de luminosidade  $L$ , desvanecimento de cor com a concentração de microalga, não esperado é contraditório a todos os outros casos. Uma possível explicação pode ser devido ao facto do pigmento da *Spirulina platensis* ser uma ficobiliproteína sensível ao pH da essência de limão ou qualquer outra reação entre o pigmento e a essência. Assim, recomenda-se que seja efectuado um estudo sobre as características químicas da essência de limão e da própria microalga (*Spirulina platensis*) para perceber a causa deste comportamento invulgar.

Por outro lado, analisando os produtos elaborados com essência de spearmint e ambas as microalgas verificam-se apenas diferenças no parâmetro  $a$ . Com a inclusão da *Chlorella vulgaris* o aumento da tonalidade verde é mais acentuado do que com a *Spirulina platensis*, embora os dois produtos apresentem o mesmo padrão comportamental com o aumento da concentração (m/m) de microalga.

Por fim, as condições de conservação estudadas apresentaram pouca ou nenhuma influência na estabilidade dos produtos, tal como Gouveia, *et al.* (2007).

## **Abordagem 2**

Para perceber melhor o que significam as diferenças de cor obtidas na medição instrumental do ponto de vista da percepção da estimulação visual, ou seja, o seu impacto em termos de percepção sensorial, efetuou-se uma abordagem alternativa aos resultados obtidos que passou pela análise da diferença de cor ( $\Delta E$ ). Na prática, esta abordagem relaciona os 3 parâmetros cromáticos ( $L$ ,  $a$  e  $b$ ) de uma forma conjunta através da seguinte equação:

$$\Delta E = \sqrt{[(\Delta L)^2 + (\Delta a)^2 + (\Delta b)^2]}$$

Em que  $\Delta L$ ,  $\Delta a$  e  $\Delta b$  representam a diferença entre o respectivo parâmetro cromático obtido de duas amostras. O valor final obtido ( $\Delta E$ ) permite analisar a percepção da diferença de cor de duas amostras através do *Just Noticeable Difference* (JND). O JND permite inferir quanto ao facto de duas amostras possuírem coloração distinta quando  $\Delta E \geq 4$  (Cruse 1997).

De acordo com os pressupostos acima mencionados, seguiu-se uma análise ao  $\Delta E$  que envolveu todos produtos elaborados (com essências e microalgas diferentes) nas diferentes condições de conservação.

A primeira condição de conservação em análise é a A (temperatura ambiente, no escuro, durante 10 semanas), como se pode ver na Tabela 14. Os  $\Delta E$  de destaque encontram-se apenas nos produtos controlo, na ausência de microalga (0,00%), uma vez que excedem o JND. No entanto, estas diferenças não foram encontradas nos produtos contendo microalga, o que sugere um impacto positivo da adição de microalga na estabilidade da cor.

**Tabela 14.** Diferenças de cor ( $\Delta E$ ) obtidas dos produtos elaborados contendo as várias essências e as diferentes concentrações (m/m) de microalgas na condição de conservação A (entre a semana 0 e semana 10)

Concentrações (m/m)	Essência (microalga)					
	Manga (Cv)	Meloa (Cv)	Limão (Cv)	Limão (Sp)	Spearmint (Sp)	Spearmint (Cv)
0,00%	3,50	1,98	4,00	3,92	5,07	2,51
0,10%	3,49	1,24	2,95	2,95	2,58	1,12
0,15%	2,32	3,10	3,16	2,27	2,42	2,10
0,20%	3,45	2,46	1,48	2,83	3,89	1,32

**Cv:** *Chlorella vulgaris*; **Sp:** *Spirulina platensis*



Relativamente à condição de conservação B (temperatura ambiente, sob luz constante, durante 10 semanas), pode-se constatar que os produtos elaborados com a essência de spearmint e a microalga *Spirulina platensis* foram os mais afectados. A Tabela 15 mostra que o produto controlo (0,00%) excede o JND, bem como aqueles com as concentrações mais altas de microalga (0,15% e 0,20%). Um indicador claro de que a fonte luminosa artificial presente na condição de conservação B pode ter exercido alguma influência na estabilidade dos produtos elaborados com esta combinação de essência e microalga.

**Tabela 15.** Diferenças de cor ( $\Delta E$ ) obtidas dos produtos elaborados contendo as várias essências e as diferentes concentrações (m/m) de microalgas na condição de conservação B (entre a semana 0 e semana 10)

Concentrações (m/m)	Essência (microalga)					
	Manga (Cv)	Meloa (Cv)	Limão (Cv)	Limão (Sp)	Spearmint (Sp)	Spearmint (Cv)
0,00%	4,04	2,86	3,70	1,63	6,27	1,23
0,10%	3,89	1,74	2,61	1,26	2,76	2,09
0,15%	2,33	1,96	2,20	1,04	4,76	2,64
0,20%	3,53	3,25	3,85	1,67	4,03	3,40

Cv: *Chlorella vulgaris*; Sp: *Spirulina platensis*

Embora de forma reduzida, as condições de conservação A e B (temperatura ambiente no escuro/sob luz constante durante 10 semanas, respetivamente) mostraram ter alguma influência na alteração da cor. O mesmo não se verificou nas condições C e D (estufa a 55°C durante 7 dias e estufa a 30°C durante 21 dias, respetivamente), uma vez que revelaram ser muito estáveis. A condição de conservação C (Tabela 16) mostrou apenas exercer uma reduzida influência no produto elaborado com essência de meloa e 0,10% de *Chlorella vulgaris*, sendo os valores de  $\Delta E$  muito reduzidos nos outros casos.

**Tabela 16.** Diferenças de cor ( $\Delta E$ ) obtidas dos produtos elaborados contendo as várias essências e as diferentes concentrações (m/m) de microalgas na condição de conservação C (entre o dia 0 e dia 7)

Concentrações (m/m)	Essência (microalga)					
	Manga (Cv)	Meloa (Cv)	Limão (Cv)	Limão (Sp)	Spearmint (Sp)	Spearmint (Cv)
0,00%	0,72	3,09	0,82	0,82	0,43	1,44
0,10%	1,46	4,19	0,60	1,23	0,96	1,89
0,15%	2,02	3,91	1,60	1,45	0,96	2,33
0,20%	1,69	3,62	2,44	2,64	1,07	2,16

Cv: *Chlorella vulgaris*; Sp: *Spirulina platensis*

Já a condição D (Tabela 17) mostrou um registo exemplar, não se observando qualquer  $\Delta E$  superior ao JND.

**Tabela 17.** Diferenças de cor ( $\Delta E$ ) obtidas dos produtos elaborados contendo as várias essências e as diferentes concentrações (m/m) de microalgas na condição de conservação D (entre o dia 0 e dia 21)

Concentrações (m/m)	Essência (microalga)					
	Manga (Cv)	Meloa (Cv)	Limão (Cv)	Limão (Sp)	Spearmint (Sp)	Spearmint (Cv)
0,00%	1,41	0,41	1,41	1,63	2,61	1,61
0,10%	1,11	0,77	1,44	1,26	1,03	0,71
0,15%	0,91	1,14	1,79	1,04	0,96	1,35
0,20%	0,75	1,29	1,97	1,67	0,62	1,45

Cv: *Chlorella vulgaris*; Sp: *Spirulina platensis*

Em conclusão, não obstante ter-se verificado um número muito reduzido de valores de  $\Delta E$  a exceder o JND, pode-se afirmar que as condições de conservação pouco ou nada influenciam a estabilidade dos produtos. Curiosamente, à temperatura de 30°C (factor caracterizador da condição de conservação D) parece favorecer ainda mais a estabilidade dos produtos.

### **Abordagem 3**

Uma última perspetiva foi analisada de acordo com os pressupostos da diferença de cor ( $\Delta E$ ) e o JND. Nesta análise compararam-se as diferenças de cor das diferentes concentrações de microalga de todos os produtos elaborados. Para tal utilizaram-se os dados relativos à semana 0 da condição de conservação D uma vez comprovada ser a condição que confere maior estabilidade.

Através da Tabela 18 facilmente se percebe que existem sempre diferenças entre os produtos controlo (0,00%) e os produtos com a concentração mínima de microalga (0,10%). No entanto, nas essências de meloa e limão (ambas com *Chlorella vulgaris*) não existem diferenças entre os produtos com diferentes concentrações de microalga. Ou seja, os incrementos de microalga parecem não se reflectir na cor do produto.

**Tabela 18.** Comparação dos valores de  $\Delta E$  dos produtos com diferentes concentrações (m/m) de microalga incorporada nas diferentes essências, na condição de conservação D (dia 0)

Essência (microalga)	Concentrações (m/m) de microalga			
	0,00%	0,10%	0,15%	0,20%
<b>Manga (Cv)</b>	X	Y	Y,Z	Z
<b>Meloa (Cv)</b>	X	Y	Y	Y
<b>Limão (Cv)</b>	X	Y	Y	Y
<b>Limão (Sp)</b>	X	Y	Y	X
<b>Spearmint (Sp)</b>	X	Y	Y,Z	Z
<b>Spearmint (Cv)</b>	X	Y	Y,Z	Z

Letras iguais correspondem a  $\Delta E < 4$  e valores diferentes a  $\Delta E \geq 4$

No caso das essências de manga (com *Chlorella vulgaris*) e spearmint (com *Chlorella vulgaris* e *Spirulina platensis*) verifica-se que é necessário existir um incremento igual ou superior a 0,10% de microalga para que se detectem diferenças de cor assinaláveis sensorialmente.

O caso dos produtos obtidos com essência de limão e a microalga *Spirulina platensis* é aquele que suscita mais curiosidade. O produto controlo (0,00%) é igual ao produto com 0,20% de microalga, no entanto os produtos com as restantes concentrações são iguais entre si, mas diferentes dos outros dois. Este facto pode indicar algum tipo de incompatibilidade entre a microalga *Spirulina platensis* e a essência de limão, como já foi referido. Este é um cenário plausível uma vez que esta mesma essência de limão, combinada com *Chlorella vulgaris*, apresentou um perfil diferente de resultados.

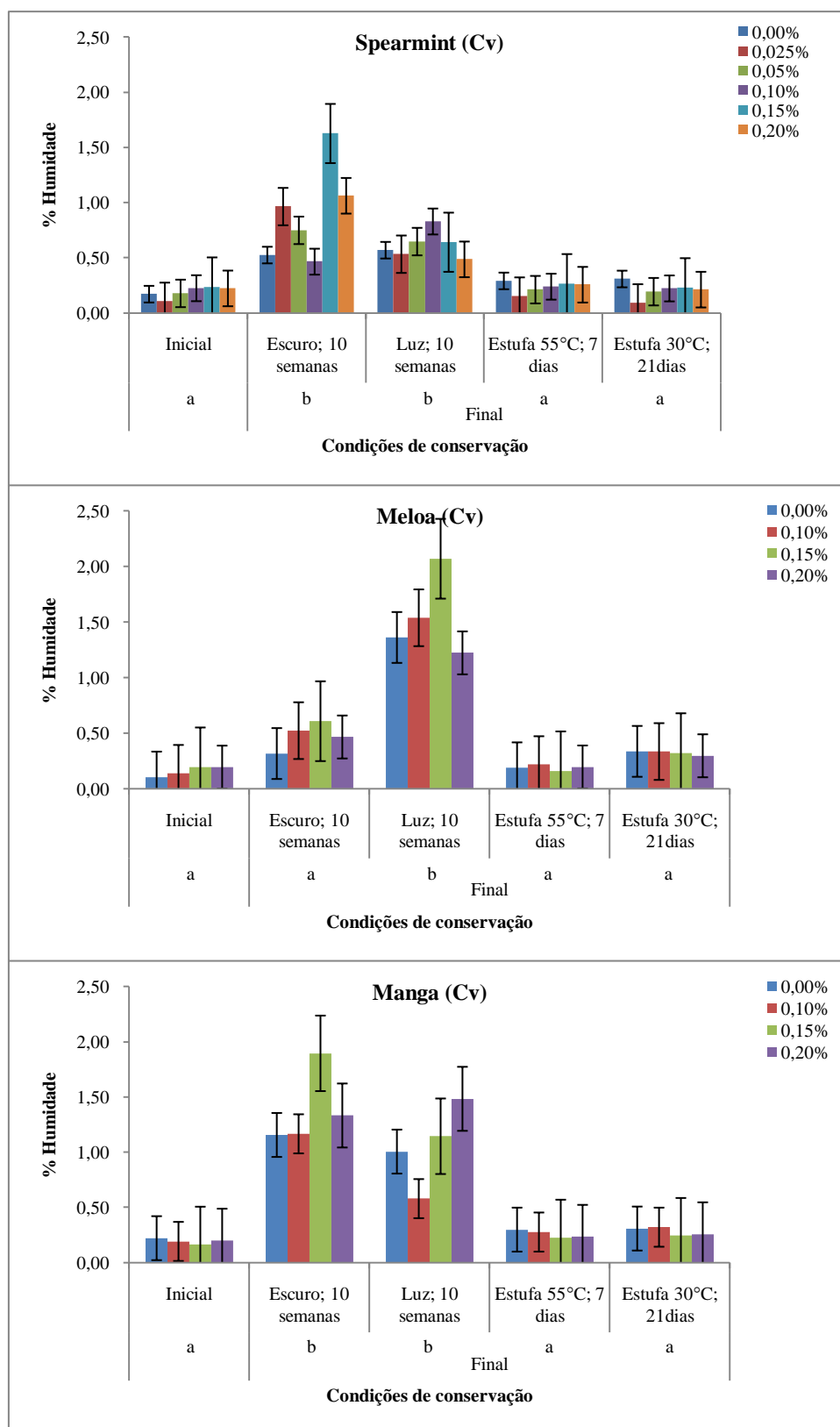
### 3.2. DETERMINAÇÃO DO TEOR DE HUMIDADE

Os teores de humidade obtidos nos produtos, no início e fim de cada condição de conservação, estão representados nas Figura 24 e Figura 25. Em primeira análise torna-se evidente o facto dos valores iniciais serem sempre iguais ou menores que os valores finais de cada condição de conservação. O produto ganha humidade ao longo do tempo, sendo higroscópico.

Verifica-se ainda que as condições de conservação A e B são aquelas que demonstram ter um maior aumento de humidade de um modo geral. Esta situação pode estar relacionada com o tempo de conservação mais longo (10 semanas) comparando com os 7 e 21 dias de conservação a temperaturas mais altas.

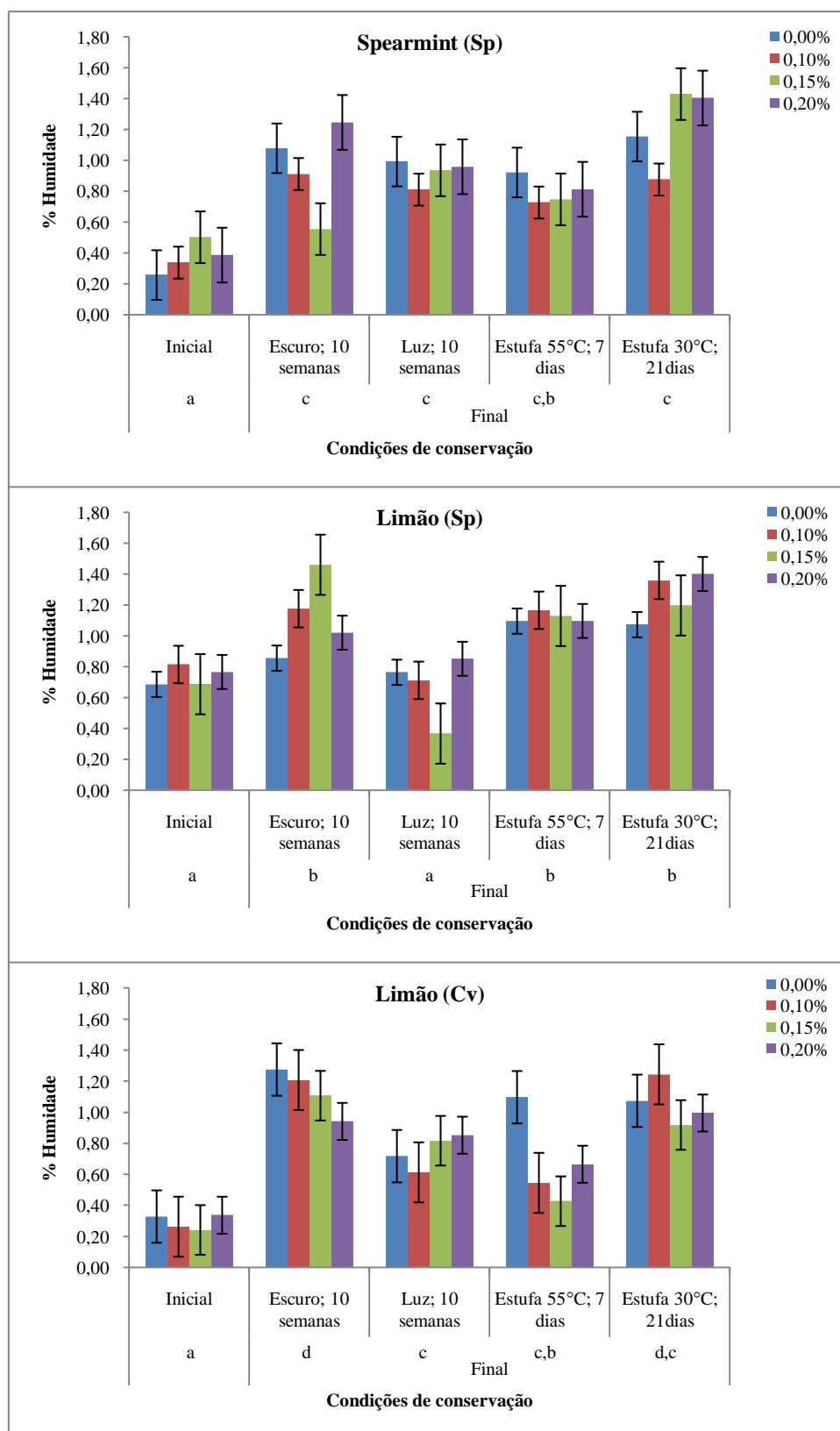
Por outro lado, as condições de conservação C e D (estufa a 55°C/7 dias e estufa a 30°C/21 dias, respetivamente) mostram duas nuances: quando abrangem os produtos com essências de spearmint, meloa e manga (contendo *Chlorella vulgaris*) tendem a manter os valores de humidade iguais aos iniciais. Porém, no caso dos produtos com as essências de spearmint (contendo *Spirulina platensis*) e limão (contendo *Spirulina platensis* e *Chlorella vulgaris*), os teores de humidade tendem para valores mais altos, sendo estes produtos mais higroscópicos e sensíveis à humidade.

Em relação àquilo que são as diferenças entre o produto controlo (0,00%) e produtos contendo microalga, pode-se afirmar que não há qualquer tipo de diferenças significativas. Este é um dado bastante relevante que indica que a adição de microalga não altera o perfil do teor de humidade nas diferentes condições de conservação. Logo, os rebuçados com microalga não apresentam necessidades especiais de conservação e terão um período de vida semelhante aos rebuçados controlo, tendo em conta o parâmetro de humidade.



**Figura 24.** Teores de humidade dos rebuçados elaborados com essências de spearmint, meloa e manga (contendo *Chlorella vulgaris*), na fase inicial e final de cada condição de conservação

Letras minúsculas diferentes correspondem a condições de conservação com teores de humidade significativamente diferentes



**Figura 25.** Teores de humidade dos rebuçados elaborados com essências de spearmint (contendo *Chlorella vulgaris*) e limão (contendo *Chlorella vulgaris* e *Spirulina platensis*), na fase inicial e final de cada condição de conservação

Letras minúsculas diferentes correspondem a condições de conservação com teores de humidade significativamente diferentes

Analisando sob o ponto de vista das combinações essência/microalga, obtém-se a Tabela 19, tabela esta que pode ser dividida em duas partes. Uma das partes é constituída pelas essências de spearmint, meloa e manga (contendo *Chlorella vulgaris*) que apresentam, no geral, imensas semelhanças entre si.

Na outra fracção da tabela constam as essências de spearmint (contendo *Chlorella vulgaris*) e limão (contendo *Chlorella vulgaris* e *Spirulina platensis*). Os produtos resultantes destas combinações de essência/microalga apresentam muitas semelhanças entre si. Mais, estes produtos são os que apresentam os valores mais elevados de humidade.

**Tabela 19.** Comparação dos valores do teor de humidade entre os produtos elaborados com diferentes essências e microalgas no início e fim de cada condição de conservação

Condição de conservação	Essência (microalga)					
	Spearmint (Cv)	Meloa (Cv)	Manga (Cv)	Spearmint (Sp)	Limão (Cv)	Limão (Sp)
<b>INICIO</b>	a	a	a	c	b	d
<b>A</b>	b	a	c	b	b,c	b,c
<b>B</b>	a	c	b	b	a,b	a,b
<b>C</b>	a	a	a	b	b	c
<b>D</b>	a	a	a	b	b	b,c

**Cv:** *Chlorella vulgaris*; **Sp:** *Spirulina platensis*

Letras minúsculas diferentes correspondem a produtos com teores de humidade significativamente diferentes

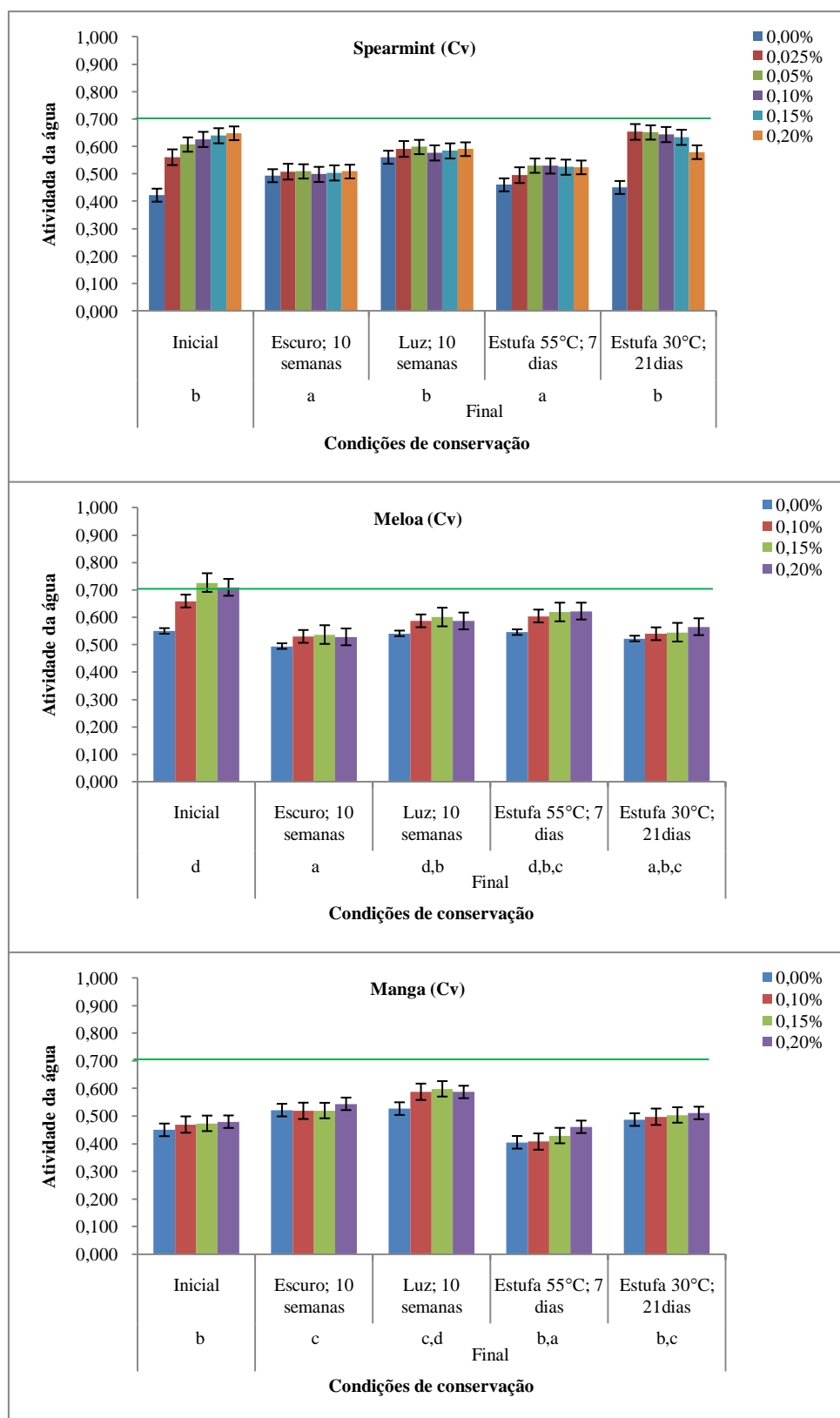
### 3.4. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA ÁGUA

Os resultados da atividade da água ( $a_w$ ), representados nas Figuras 26 e 27, tal como os da humidade, indicam que o produto controlo (0,00%) e os produtos contendo microalga não apresentam diferenças significativas entre eles. Exceção feita ao produto com essência de spearmint contendo *Chlorella vulgaris*, cuja análise estatística revela existirem diferenças significativas entre o produto controlo e aqueles com concentrações de microalga superiores a 0,025%, tendo o controlo um valor de  $a_w$  mais baixo.

Relativamente àquilo que são os valores iniciais e finais de cada condição de conservação, não se pode afirmar que exista um comportamento padrão entre os diversos produtos obtidos (Figura 26 e Figura 27). Este facto contrasta um pouco com os teores de humidade obtidos uma vez que não existem semelhanças no perfil de comportamento entre ambos.

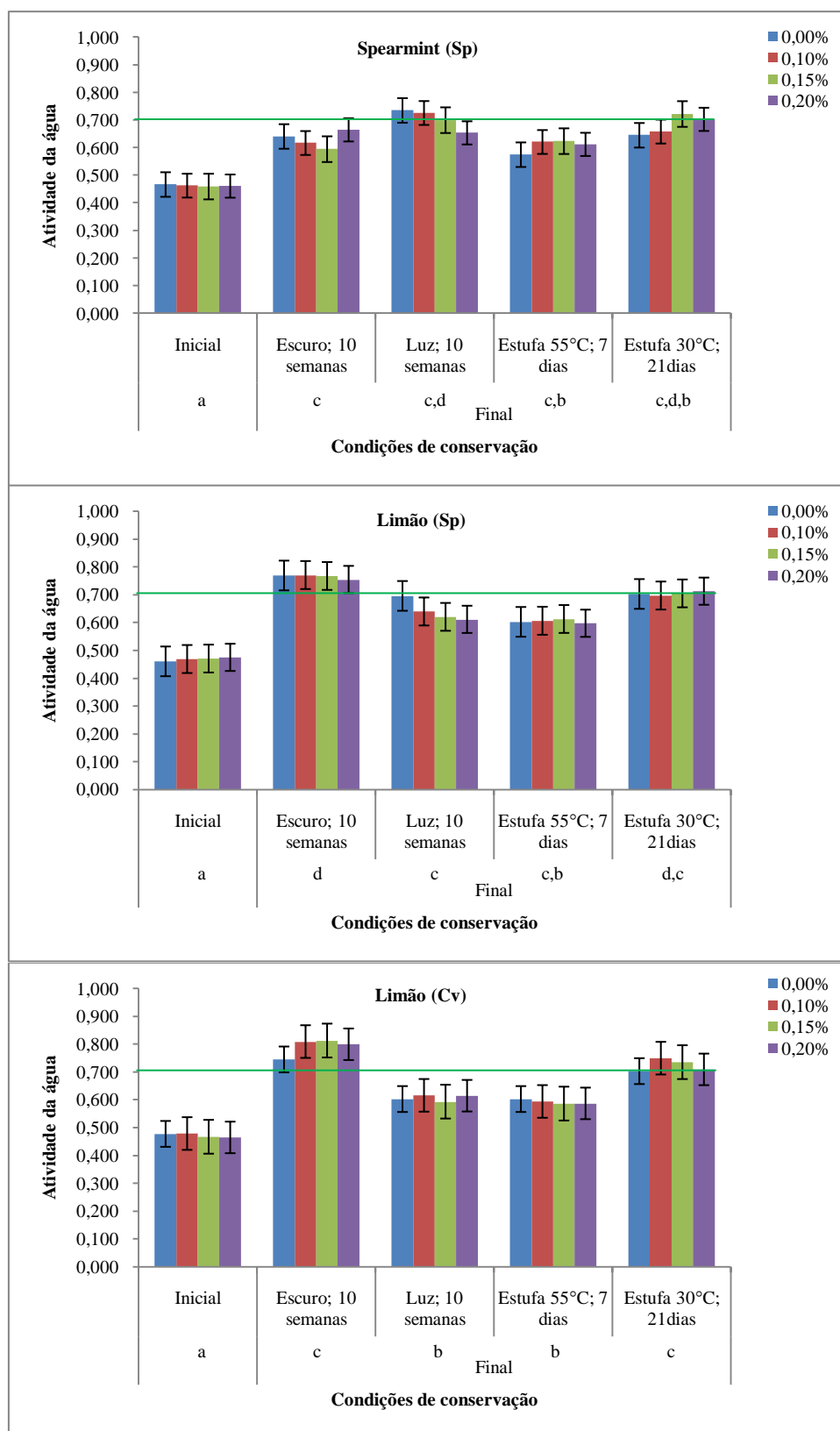
Independentemente da variabilidade existente, o fundamental é perceber se os resultados obtidos se encaixam na gama de valores de  $a_w$  que conferem segurança aos produtos. De acordo com (Adams e Moss 2008), é preciso haver um valor de  $a_w$  igual ou superior a 0,6 para que a deterioração de um alimento tenha causas microbiológicas. O mesmo autor refere ainda que os rebuçados são categorizados como produtos cujo intervalo de  $a_w$  abrange valores entre os 0,6 e 0,7. Nesta perspetiva, os resultados obtidos são bastante aceitáveis uma vez que a maior parte encontra-se no intervalo de  $a_w$  referido por (Adams e Moss 2008), ou até abaixo deste (em muitos dos casos). Os casos que excedem valores de  $a_w$  de 0,7 são pontuais.





**Figura 26.** Atividade da água dos rebuçados elaborados com essências de spearmint, meloa e manga (contendo *Chlorella vulgaris*), na fase inicial e final de cada condição de conservação. Letras minúsculas diferentes correspondem a condições de conservação com  $a_w$  significativamente diferentes.

— Valor máximo de  $a_w$  que categoriza os rebuçados (Adams e Moss 2008)



**Figura 27.** Atividade da água dos rebuçados elaborados com essências de spearmint (contendo *Chlorella vulgaris*) e limão (contendo *Chlorella vulgaris* e *Spirulina platensis*), na fase inicial e final de cada condição de conservação. Letras minúsculas diferentes correspondem a condições de conservação com  $a_w$  significativamente diferentes.

— Valor máximo de  $a_w$  que categoriza os rebuçados (Adams e Moss 2008)

Tal como para os teores de humidade, também no  $a_w$  se analisou as possíveis diferenças estatísticas existentes entre os produtos elaborados com diferentes essências e microalgas. A Tabela 20 resume as comparações efetuadas e permite perceber que existem dois padrões de comportamento: o primeiro é o efeito positivo que as condições de conservação A e B proporcionam aos produtos com essências de spearmint, manga e meloa (contendo *Chlorella vulgaris*); e em segundo lugar o efeito negativo que as condições C e D implicam nos restantes produtos.

Estas ocorrências não são inteiramente corroboradas pelos teores de humidade obtidos, existindo alguma discrepância entre o que seria esperado (comportamento análogo entre humidade e  $a_w$ ) e o que realmente se sucedeu (comportamento contrastante entre humidade e  $a_w$ ).

**Tabela 20.** Comparação do  $a_w$  entre os produtos elaborados com diferentes essências e microalgas no início e fim de cada condição de conservação

Condição de conservação	Essência (microalga)					
	Spearmint (Cv)	Meloa (Cv)	Manga (Cv)	Spearmint (Sp)	Limão (Cv)	Limão (Sp)
<b>INICIO</b>	b	c	a	a	a	a
<b>A</b>	a	a	a	b	c	c
<b>B</b>	a	a	a	c	a	b
<b>C</b>	b	c	a	c	c	c
<b>D</b>	b	b,a	a	c	c	c

**Cv:** *Chlorella vulgaris*; **Sp:** *Spirulina platensis*

Letras minúsculas diferentes correspondem a produtos com  $a_w$  significativamente diferentes

### 3.4. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

A Figura 28 apresenta os resultados da percentagem da atividade antioxidante, medidos pela sequestração de radicais livres (vulgo RSA), para os rebuçados elaborados com essência de limão e *Chlorella vulgaris*. Estes resultados mostram que o produto controlo, embora não possua qualquer % de microalga, é detentor de atividade antioxidante. Aliás, previamente a ser colocado em qualquer condição de conservação, o produto com menor valor de RSA é aquele com 0,20% de *Chlorella vulgaris*. Por outro lado, a concentração de 0,10% assume-se como aquela que confere maior atividade antioxidante.

No término das condições de conservação, os resultados acabaram por mostrar que o produto controlo acabou por ser aquele com menor % de RSA. As condições de conservação C e D comprovam que é na concentração de 0,10% de *Chlorella vulgaris* que a atividade antioxidante é mais elevada, corroborando a tendência inicial.

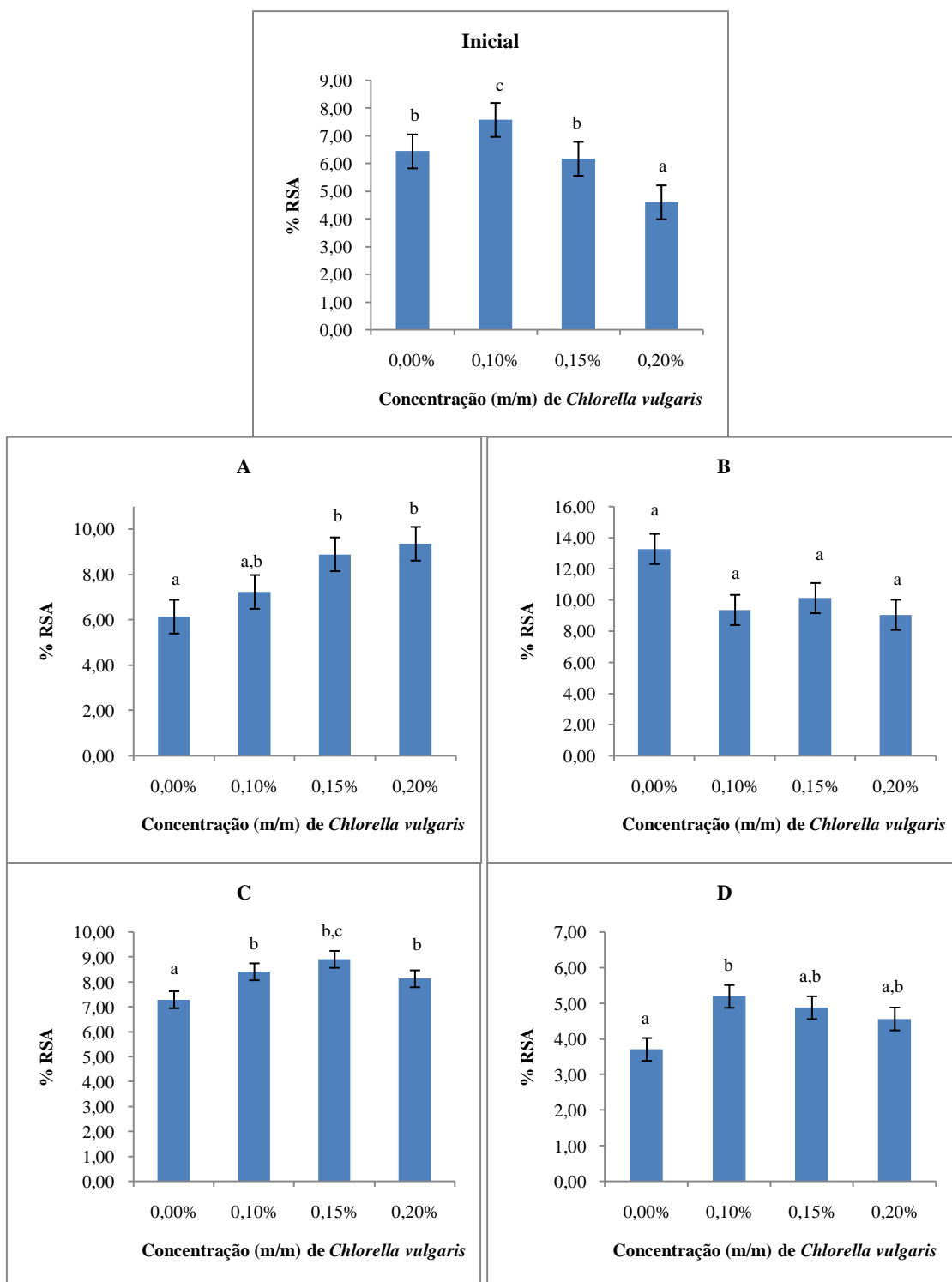
Em relação aos rebuçados elaborados com essência de limão e *Spirulina platensis*, existem semelhanças com aqueles elaborados com *Chlorella vulgaris*, sendo que a mais evidente é o facto de ser na concentração de 0,10% de microalga que os valores de RSA são mais elevados (Figura 29).

De realçar que a condição de conservação B detém a capacidade de aumentar significativamente os valores de RSA para os produtos contendo as duas microalgas (Tabela 21). Este é um dado bastante relevante uma vez que a condição de conservação B é caracterizada pela submissão dos produtos a uma fonte luminosa. Consequentemente, existe uma propensão para um efeito de retardamento da degradação de clorofilas (Streit, et al. 2005) que a luz potência e sugere reflectir-se numa manutenção ou até mesmo um aumento da atividade antioxidante.

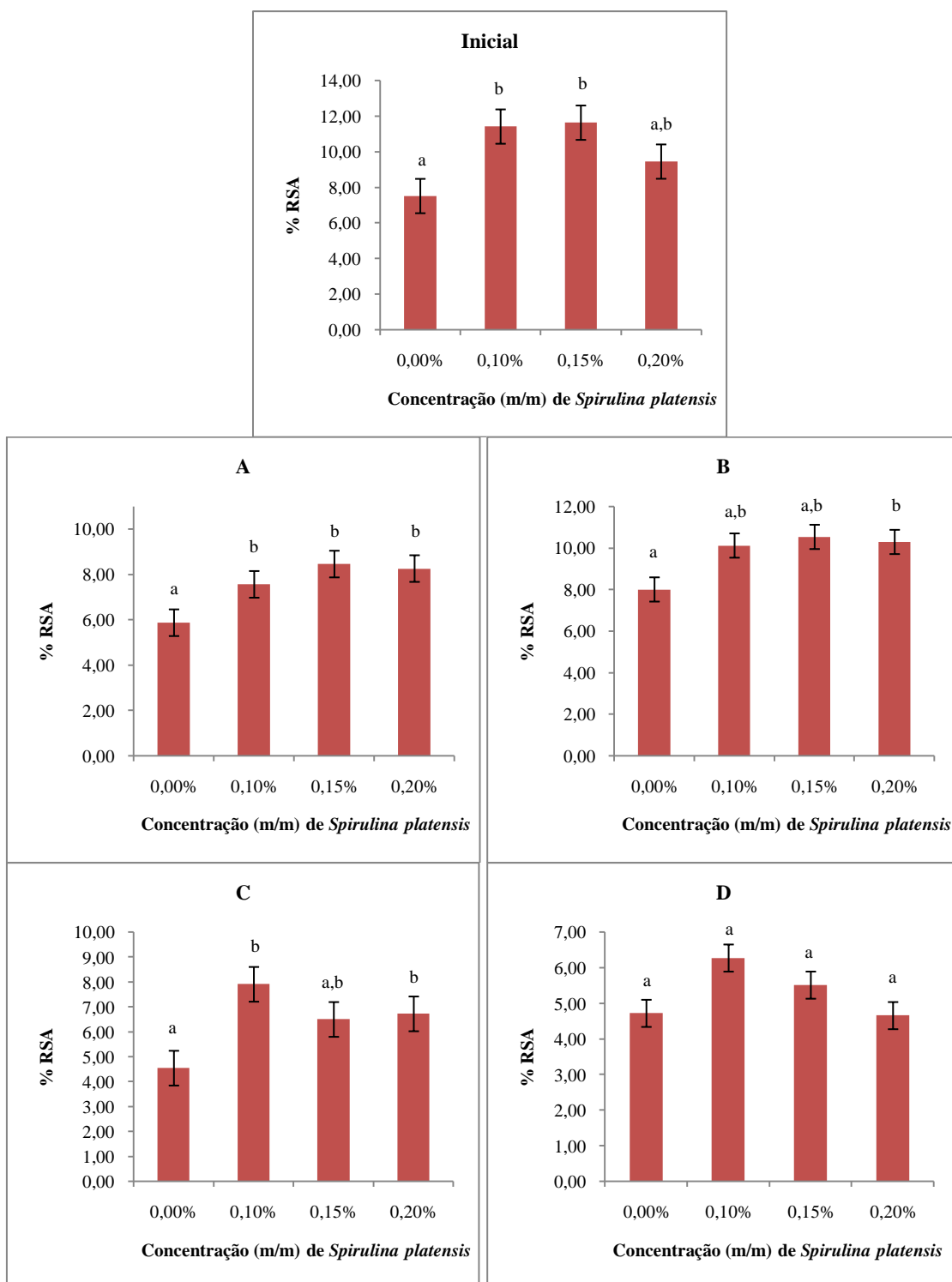
**Tabela 21.** Comparação estatística do RSA entre o início e fim de cada condição de conservação entre os rebuçados elaborados com essência de limão e as diferentes microalgas

Microalga	Início	A	B	C	D
<i>Spirulina platensis</i>	c	a	c,a,b	a	a
<i>Chlorella vulgaris</i>	a	a,b	b	a,b	a

No geral, os resultados são bastante similares, independentemente da microalga utilizada na elaboração dos produtos.



**Figura 28.** RSA (*Radical Scavenging Activity*) dos rebuçados elaborados com essência de limão contendo *Chlorella vulgaris*, na fase inicial e final de cada condição de conservação



**Figura 29.** RSA (*Radical Scavenging Activity*) dos rebuçados elaborados com essência de limão contendo *Spirulina platensis*, na fase inicial e final de cada condição de conservação

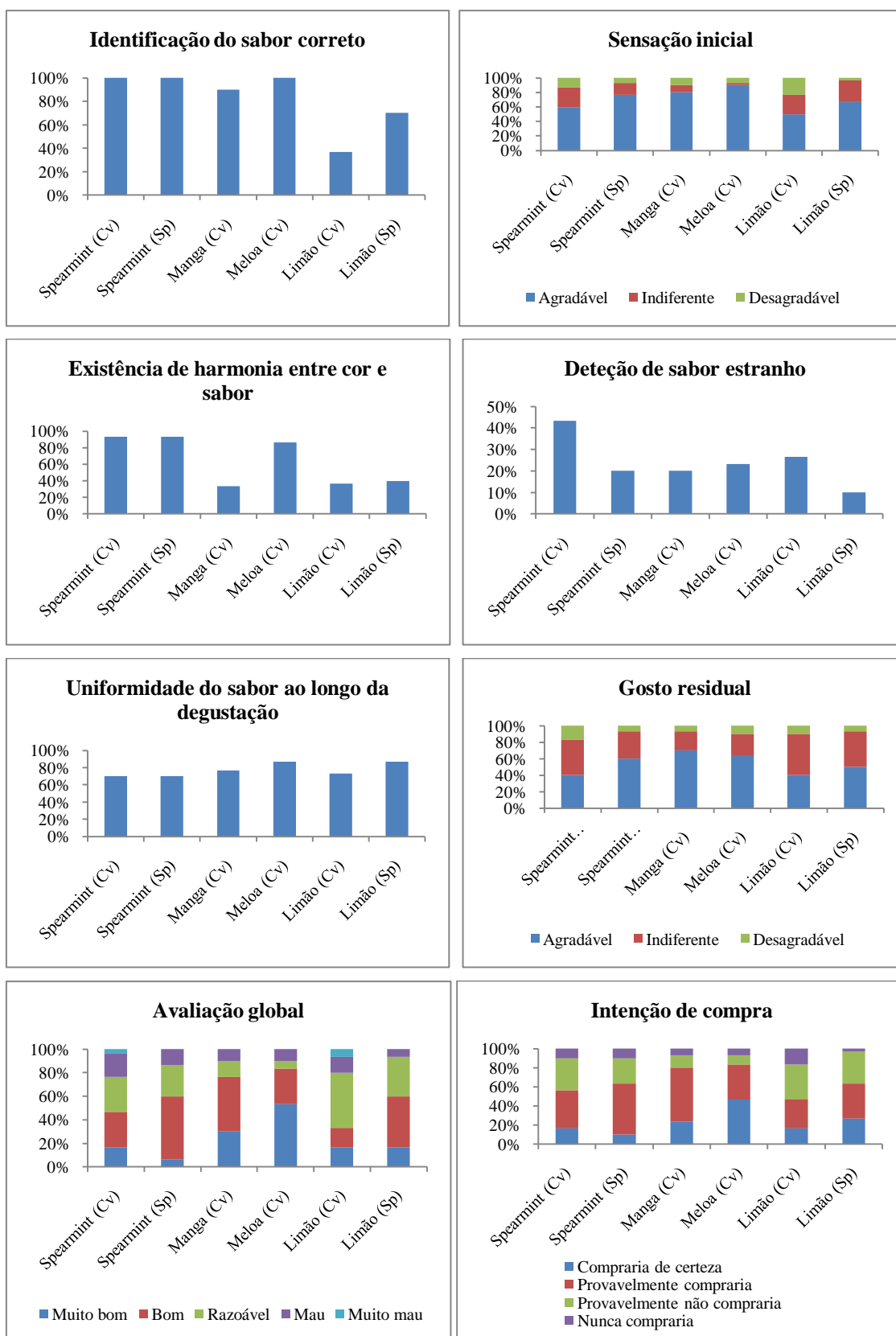
### 3.5. ANÁLISE SENSORIAL

Os resultados da análise sensorial (Figura 30) indicaram um perfil de respostas favorável aos rebuçados elaborados com essência de meloa e, num plano secundário, essência de manga. Por outro lado, os rebuçados com essência de limão foram os que obtiveram piores classificações, tendo mesmo existido maior dificuldade em identificar corretamente o seu sabor.

Os rebuçados com essência de spearmint e *Chlorella vulgaris* revelaram ser mais sensíveis à deteção de um sabor estranho por parte dos provadores. No entanto, a uniformidade do sabor ao longo da degustação indicou resultados muito semelhantes entre todos os rebuçados.

Em relação aos parâmetros de gosto residual e avaliação global, destacaram-se os rebuçados com essências de manga e meloa. Curiosamente, mesmo obtendo uma fraca avaliação global, os rebuçados com essência de limão e *Spirulina platensis* registaram a segunda melhor classificação na intenção de compra (em conjunto com a essência de manga), logo a seguir aos rebuçados com essência de meloa.

Por fim, a existência (ou não) de harmonia entre cor e sabor não se refletiu nos restantes parâmetros.



**Figura 30.** Resultados da análise sensorial efetuada aos diferentes rebuçados contendo diferentes essências e microalgas. Cv, *Chlorella vulgaris*; Sp, *Spirulina platensis*



## 4. CONCLUSÕES

A incorporação das microalgas *Chlorella vulgaris* e *Spirulina platensis* afetaram de modo distinto as várias propriedades estudadas nos produtos desenvolvidos. Em relação ao parâmetro da cor, verificou-se que existe um incremento de coloração verde que acompanha as concentrações crescentes de microalga. No entanto, este incremento de cor entre os produtos com diferentes concentrações de microalga, apenas se torna perceptível sensorialmente com adições de microalga iguais ou superiores a 0,10%.

A humidade e atividade da água ( $a_w$ ) revelaram ter um comportamento bastante semelhante entre os produtos controlo e com microalgas. Os produtos com microalga seguem o perfil higroscópico dos produtos controlo e apresentam boa estabilidade no geral, tal como acontece com o  $a_w$ .

Os produtos com maior atividade antioxidante são, no geral, os que contêm 0,10% de microalga, embora este aumento nem sempre seja significativo.

As diferentes condições de conservação mostraram não ter influência no parâmetro de cor e atividade antioxidante. Por outro lado, os produtos mostraram diferentes comportamentos de humidade e  $a_w$  nas diferentes condições de conservação.

A análise sensorial revelou que os rebuçados com melhores classificações foram aqueles contendo essência de meloa, seguido da manga.

Por fim, convém destacar que estamos diante um produto cuja formulação contém uma fonte de compostos bioativos (como são as microalgas) e deste modo sugere-se a criação de uma nova marca que abranja estes produtos. Tal deve ser efetuado devido ao carácter inovador dos produtos em questão e ao consequente acréscimo de valor que deve ser transmitido para o consumidor.

## **5. TRABALHOS FUTUROS**

Embora se tenham dado contributos relevantes para a incorporação de microalgas em rebuçados, torna-se pertinente continuar a estudar aspectos importantes no desenvolvimento deste produto:

- Conhecimento dos aspetos físicos e químicos das essências utilizadas;
- Estudar coeficiente de solubilidade entre as microalgas e essências utilizadas;
- Estudar a possibilidade de incorporação de concentrações mais elevadas de microalga;
- Perceber de que modo é que a etapa de cozedura da massa pode afetar os parâmetros físicos e químicos;

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abalde, Julio, Angeles Cid, e Pablo Fidalgo. *Microalgas: cultivo y aplicaciones*. Montagem por Universidade da Coruña. Espanha, 1995.

Adams, M.R., e M.O. Moss. *Food Microbiology*. 3ª Edição. Cambridge: RSC Publishing, 2008.

Albert, N., R. Wague, M. Mbailao, e N. Fabienne. “Changes in the physico-chemical properties of *Spirulina platensis* from three production sites in Chad.” *Journal of Animal & Plant Sciences*, 2012: 1811-1822.

Andrade, M. R., e J. A. V. Costa. “Cultivo da microalga *spirulina platensis* em fontes alternativas de nutrientes.” *Ciência e Agrotecnologia*, 2008: 1551-1556.

AOAC. *Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists*. 17ª Edição. Vol. 2. Gaithersburg, Maryland: Association of Official Analytical Chemists, 2000.

Arterburn, L. M., H. A. Oken, H. B. Hall, J Hamersley, C. N. Kuratko, e J. P. Hoffman. “Algal-Oil Capsules and Cooked Salmon: Nutritionally Equivalent Sources of Docosahexaenoic Acid.” *Journal of the American Dietetic Association*, 2008: 1204-1209.

Association Algosopnette. *Spirulina platensis, Spiruline souche, Spiruline aquariophilie*. <http://www.algosopnette.com/association/spiruline.html> (acedido em 17 de Julho de 2014).

Athayde, A. “Indústrias agregam conveniências.” *Engenharia de Alimentos*, 1999: 39-41.

Barsanti, Laura, e Paolo Gualtieri. *Algae: anatomy, biochemistry and biotechnology*. Florida: CRC Press, 2006.

Batista, A. P. *Natural pigments and microalgal biomass in colloidal food systems : rheological characterization*. Tese de Doutorado, Huelva: Universidad de Huelva, 2013.

Batista, A. P., L Gouveia, M. C. Nunes, J. M. Franco, e A. Raymundo. “Microalgae biomass as a novel functional ingredient in mixed gel systems.” In *Gums and Stabilisers for the Food Industry 14*, de P. A. Williams e G. O. Phillips, 487-494. Cambridge: The Royal Society of Chemistry Publishing, 2008.

Becker, E. W. “Micro-algae as a source of protein.” *Biotechnology Advances*, 2007: 207-210.

- Belay, A., Y. Ota, K. Miyakawa, e H Shimamatsu. "Current knowledge on potential health benefits of *Spirulina platensis*." *Journal of Applied Phicology*, 1993: 235-241.
- Bondet, V., W. Brand-Williams, e C. Berset. "Kinetics and Mechanisms of Antioxidant Activity using the DPPH Free Radical Method." *Academic Press Limited*, 14 de Janeiro de 1997: 609-615.
- Borowitzka, M. A. "Company news." *Journal of Applied Phycology*, 1998: 417.
- Borowitzka, Michael A. "Commercial production of microalgae: ponds, tanks, tubes and fermenters." *Journal of Biotechnology*, 1999: 313-321.
- Boutin, R. "Candy and Confections." In *Book on Food Proteins*, de Knechtel Research Science, 465 - 476. Illinois: Wiley, 2000.
- Brand-Williams, W., M. E. Cuveliet, e C. Berset. "Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity." *LWT - Food Science and Technology*, 1995: 25 - 30.
- Brown, M.R., M. Mular, I. Miller, C. Farmer, e C. Trenerry. "The vitamin content of microalgae used in aquaculture." *Journal of Applied Phycology*, 1999: 247-255.
- Cardozo, K. H. M., et al. "Metabolites from algae with economical impact." *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, 2007: 60-78.
- Chalmers, A. "Hard Candy: Processing and Quality Observations." *PMCA Production Conference*. The Manufacturing Confectioner, 1983. 49-56.
- Chisti, Yusuf. "Biodiesel from microalgae." *Biotechnology Advances*, 2007: 294-306.
- Chu, W. L. "Potential applications of antioxidant compounds from algae." *Current Topics in Nutraceutical Research*, 2011: 83-98.
- Cruse, Phil. *Introduction to the CIE LCH & Lab Colour Spaces*. 1997. [http://www.colourphil.co.uk/lab\\_lch\\_colour\\_space.shtml](http://www.colourphil.co.uk/lab_lch_colour_space.shtml) (acedido em 20 de Junho de 2014).
- Dimancescu, D., e K. Dwenger. *O segredo do lançamento de produtos*. HSM Management, 1997.
- Diplock, A., P. Aggett, M. Ashwell, F. Bornet, E. Fern, e M. Roberfroid. "Scientific Concepts of Functional Foods in Europe: Consensus Document." *British Journal of Nutrition*, 1999: 1-27.

Enzing, C., M. Ploeg, M. Barbosa, e L. Sijtsma. *Microalgae-based products for the food and feed sector: an outlook for Europe*. Luxemburgo: European Commission, 2014.

Gaese, H. "Chemical Composition and Potential Application of *Spirulina platensis*." *International Journal of Agr. & Env.*, 2012: 32-40.

Gouveia, L., A. Batista, A. Miranda, J. Empis, e A. Raymundo. "Chlorella vulgaris biomass used as colouring source in traditional butter cookies." *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 2007: 433-436.

Gouveia, L., A. Raymundo, A. Batista, I. Sousa, e J. Empis. "Chlorella vulgaris and Haematococcus pluvialis biomass as colouring and antioxidant in food emulsions." *European Food Research and Technology*, 2005: 362-367.

Gouveia, L., E. Gomes, e J. Empis. "Potential use of a microalgal (*Chlorella vulgaris*) in the pigmentation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) muscle." *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und-Forschung*, 1996b: 75-79.

Gouveia, L., G. Choubert, E. Gomes, N. Pereira, J. Santinha, e J. Empis. "Pigmentation of gilthead seabream, *Sparus aurata* (Lin 1875), using *Chlorella vulgaris* microalga." *Aquaculture Research*, 2002: 987-993.

Gouveia, L., P. Rema, O. Pereira, e J. Empis. "Colouring ornamental fish (*Cyprinus carpio* and *Carassius auratus*) with microalgal biomass." *Aquaculture Nutrition*, 2003: 123-129.

Gouveia, L., V. Veloso, A. Reis, H. Fernandes, J. Empis, e J. Novais. "Chlorella vulgaris used to colour egg yolk." *Journal of Food Science and Technology*, 1996a: 167-172.

Graham, Linda E., e Lee Warren Wilcox. *Algae*. Prentice Hall, 2000.

Guil-Guerrero, J. L., R. Navarro-Juárez, J. C. López-Martinez, P. Campra-Madrid, e M. M. Reboloso-Fuentes. "Functional properties of the biomass of three microalgal species." *Journal of Food Engineering*, 2004: 511-517.

Halle, I., P. Janczyk, G. Freyer, e W. B. Souffrant. "Effect of microalgae *Chlorella vulgaris* on laying hen performance." *Archiva Zootechnica*, 2009: 5-13.

Held, P., e K. Raymond. "Determination of algal cell lipids using Nile red using microplates to monitor neutral lipids in *Chlorella vulgaris*." *BioTek Instruments, Inc.* 2014. <http://www.biotek.com/> (acedido em 30 de Junho de 2014).

Hoek, C. Van Den, D. G. Mann, e H. M. Jahns. *Algae: An Introduction to Phycology*. New York: Cambridge University Press, 1995.

Jornal Oficial da União Europeia. “Regulamento (UE) N. o 432/2012 da Comissão.” *Estabelece uma lista de alegações de saúde permitidas relativas a alimentos que não referem a redução de um risco de doença ou o desenvolvimento e a saúde das crianças*. Comissão Europeia, 16 de maio de 2012.

Kato, T. “Blue pigment from Spirulina.” *New Food Industry*, 1994: 17-21.

Lundquist, T.J., I.C. Woertz, N.W.T. Quinn, e J.R. Benemann. *A Realistic Technology and Engineering Assessment of Algae Biofuel Production*. California: University of California, 2010.

Metting, F. B. “Biodiversity and application of microalgae.” *Journal of Industrial Microbiology*, 1996: 477-489.

Miao, Xiaoling, e Qingyu Wu. “Biodiesel production from heterotrophic microalgal oil.” *Bioresource Technology*, 6 de Abril de 2006: 841-846.

Molyneux, P. “The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant.” *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, 2004: 211-219.

Morrison, I. *A Segunda Curva*. Rio de Janeiro: RJ. Ed. Campus, 1997.

NHS Choices. “Miracle foods: myths and the media.” *NHS Choices - Your health, your choices*. 1 de Janeiro de 2011. [www.nhs.uk](http://www.nhs.uk) (acedido em 23 de Julho de 2014).

Olaizola, Miguel. “Commercial development of microalgal biotechnology: from the test tube to the marketplace.” *Biomolecular Engineering*, 2003: 459-466.

Ötles, S., e R. Pire. “Fatty acid composition of Chlorella and Spirulina microalgae.” *Journal of AOAC International*, 2001: 1708-1714.

Panahi, Y., S. Tavana, A. Sahebkar, H. Masoudi, e N. Madanchi. “Impact of adjunctive therapy with Chlorella vulgaris extract on antioxidant status, pulmonary function, and clinical symptoms of patients with obstructive pulmonary diseases.” *Scientia Pharmaceutica*, 2012: 719-730.

Pettit, B. *The International "Healthy" Confectionery Market (Special report)*. Leatherhead Food Research Association, 1999.

Pickford, E., e N. Jardine. "Functional confectionery." Cap. 11 em *Functional foods: concept to product*, de Woodhead Publishing Limited, montagem por G. Gibson e C. Williams, 259-286. Cambridge: CRC Press, 2000.

Priyadarshani, I., e B. Rath. "Bioactive compounds from microalgae and cyanobacteria: utility and applications." *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 2012: 4123-4130.

Pulz, Otto, e Wolfgang Gross. "Valuable products from biotechnology of microalgae." *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2004: 635-648.

Ramadan, M., M. Asker, e Z. Ibrahim. "Functional Bioactive Compounds and Biological Activities of *Spirulina platensis* Lipids." *Czech J. Food. Sci.*, 2008: 211-222.

Raymundo, A., L. Gouveia, A. Batista, J. Empis, e I. Sousa. "Fat mimetic capacity of *Chlorella vulgaris* biomass in oil-in-water food emulsions stabilised by pea protein." *Food Research International*, 2005: 961-965.

Regulamento (UE) N.º 432/2012 da Comissão de 16 de maio de 2012 que estabelece uma lista de alegações de saúde permitidas relativas a alimentos que não referem a redução de um risco de doença ou o desenvolvimento e a saúde das crianças. "Jornal Oficial da União Europeia."

Reinehr, C.O., e J.A. Costa. "Repeated batch cultivation of the microalga *Spirulina platensis*." *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2006: 937-943.

Richmond, Amos. *Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology*. Oxford: Blackwell Publishing, 2004.

Roberfroid, M. "Defining functional foods." In *Functional Foods - Concept to product*, de G. Gibson e C. Williams, 9-28. Cambridge: Woodhead Publishing Limited, 2000.

Romay, C., e R. Gonzalez. "Phycocyanin is an antioxidant protection of human erythrocytes against lysis by peroxy radicals." *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 2000: 367-368.

Safi, C., B. Zebib, O. Merah, P. Pontalier, e C. Vaca-Garcia. "Morphology, composition, production, processing and applications of *Chlorella vulgaris*: A review." *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 2014: 265-278.

Saranraj, P., e S. Sivasakthi. "Spirulina platensis - Food for future: a review." *Asian Journal of Pharmaceutical Science & Technology*, 2014: 26-33.

- Shimamatsu, H. "Mass production of Spirulina, an edible microalga." *Hydrobiologia*, 2004: 39-44.
- Soletto, D., L. Binaghi, A. Lodi, J. C. M. Carvalho, e A. Converti. "Batch and fed-batch cultivations of Spirulina platensis using ammonium sulphate and urea as nitrogen sources." *Aquaculture*, 2005: 217-224.
- Spolaore, Pauline, Claire Joannis-Cassan, Elie Duran, e Arsène Isambert. "Commercial Applications of Microalgae." *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2006: 87-96.
- Streit, N. M., L. P. Canterle, M. Weber do Canto, e L. H. H. Hecktheuer. "The Chlorophylls." *Ciência Rural*, 2005: 748 - 755.
- Taylor & Francis. *Spirulina Platensis (Arthrospira): Physiology, Cell-Biology And Biotechnology*. Montagem por A. Vonshak. Londres: CRC Press, 1997.
- Thaipong, K., U. Boonprakob, K. Crosby, L. Cisneros-Zevallos, e D. H. Byrne. "Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts." *Journal of Food Composition and Analysis*, 2006: 669 - 675.
- Tokusoglu, O., e M. K. Unal. "Biomass nutrient profiles of three microalgae: Spirulina platensis, Chlorella vulgaris, and Isochrysis galbana." *Journal of Food Science*, 2003: 1144-1148.
- Tonon, T., D Harvey, T. R. Larson, e I. A. Graham. "Long chain polyunsaturated fatty acid production and partitioning to triacylglycerols in four microalgae." *Phytochemistry*, 2002: 15-24.
- Weststrate, J., G. Poppel, e P. Verschuren. "Functional foods, trends and future." *British Journal of Nutrition*, 2002: 233-235.
- Yamaguchi, K. "Recent advances in microbial bioscience in Japan, with special reference to utilization of biomass and metabolites: a review." *Journal of Applied Phycology*, 1997: 487-502.
- Yongmanitchai, Wichien, e Owen P Ward. "Screening of algae for potential alternative sources of eicosapentaenoic acid." *Phytochemistry*, 1991: 2963-2967.



## ANEXOS

### Anexo I - Ficha técnica da microalga *Chlorella vulgaris* cedida pela empresa Allma

ESPECIFICAÇÕES ORGANOLÉPTICAS	
Odor	Odor característico
Aparência	Pó fino e macio de clorofila verde
Sabor	Algas
Tamanho dos grãos   Malha	≤ 90 µm

MACRONUTRIENTES (g / 100 g)	
Hidratos de carbono	12,1
Fibra dietética	0,5
Lípidos	9,2
Proteínas	62,5
Cinzas	10,9
Humidade	4,8
Valor energético	381 kcal

PIGMENTOS / CAROTENÓIDES (mg / 100 g)	
Luteína	74
Zeaxantina	40
Clorofila	2106
α-caroteno	115
β-caroteno	106

ÁCIDOS GORDOS (g / 100 g)	
Ácidos gordos saturados	2,53
Ácidos gordos monoinsaturados	1,21
Ácidos gordos polinsaturados	5,46
Ácidos gordos ômega-3	3,28
Ácidos gordos ômega-6	2,17
Ácidos gordos ômega-9	0,53
Ácido palmítico	1,85
Ácido palmitoleico	0,68
Ácido esteárico	0,68
Ácido oleico	0,53
Ácido linoleico	2,17
Ácido α-linoleico	3,28

MINERAIS / OLIGOELEMENTOS (mg / 100 g)	
Sódio	480
Fósforo	1200
Potássio	2600
Cálcio	1600
Selénio	< 1
Ferro	240
Magnésio	180
Zinco	6,8
Cobre	2,8

Iodo	0,042
------	-------

VITAMINAS (valores por 100 g)	
Vitamina A   Retinol	< 0,02 mg
Vitamina B1   Tiamina	22,0 µg
Vitamina B2   Riboflavina	49,1 µg
Vitamina B3   Niacina	78,7 µg
Vitamina B9   Ácido fólico	27,4 µg
Vitamina B6   Fosfato de piridoxal	65,3 µg
Vitamina B5   Ácido pantoténico	69,5 µg
Vitamina B12   Cianocobalamina	0,08 µg
Vitamina E   Tocoferol	2,5 mg
Vitamina C   Ácido ascórbico	< 10 mg

AMINOÁCIDOS (g / 100 g)	
Ácido glutâmico	5,11
Metionina	1,51
Prolina	2,16
Hidroxiprolina	1,15
Lisina	3,60
Tirosina	2,47
Fenilalanina	2,56
Serina	3,08
Histidina	1,22
Glicina	2,90
Treonina	2,68
Arginina	4,11
Alanina	4,29
Valina	3,70
Ácido aspártico	6,95
Triptófano	1,97
Isoleucina	3,66
Leucina	4,84
Cistina	0,83
Asparagina	0,041
Glutamina	0,022

ESPECIFICAÇÕES MICROBIOLÓGICAS	
Contagem total de aeróbios a 30°C	$2,0 \times 10^5$
Contagem de <i>Staphylococcus aureus</i>	$< 1,0 \times 10^1$
<i>Listeria monocytogenes</i>	$< 1,0 \times 10^1$
<i>E. coli</i>	$< 1,0 \times 10^1$
<i>Salmonella</i>	Não detectado em 25 g
<i>Pseudomonas</i> spp.	$< 1,0 \times 10^1$
Leveduras	$< 1,0 \times 10^1$
Bolores	$< 1,0 \times 10^1$
<i>Vibrio</i> sp.	$< 1,0 \times 10^1$

METAIS PESADOS	
Chumbo	0,9 mg / kg
Cádmio	< 0,10 mg / kg
Mercúrio	< 0,003 mg / kg
Arsénio	< 2,00 mg / kg
Estanho	2,00 mg / kg
MICROCISTINAS	
Microcistina LR	< 1,2 µg / g
MICOTOXINAS	
Aflatoxina B1; B2; G1; G2	< 0,30 µg / kg
Soma de todas as aflatoxinas	< 1,20 µg / kg
Deoxinivalenol	< 50,00 µg / kg
Patulina	< 5,00 µg / kg
Zearalenona	< 15,00 µg / kg
DIOXINAS E FURANOS	
PCDD + PCDF	0 – 0,06 pg / g
Soma de Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos	0 – 20 µg / kg
Bifenilos policlorados	0 – 0,69 pg / g
PESTICIDAS	
Foram testados mais de 200	< Limite de Quantificação

**Anexo II** – Ficha técnica da *Spirulina platensis* adquirida comercialmente

MACRONUTRIENTES (valores por 100 g)	
Energia	309 kcal
Proteína	59,9 g
Hidratos de carbono	11,3 g
Lípidos	4,1g
Fibra	16,4 g
VITAMINAS E MINERAIS (valores por 100 g)	
Sódio	0,36 g
Ferro	82,7 mg
Tiamina (Vitamina B1)	4,4 mg
Riboflavina (Vitamina B2)	6,9 mg
Zinco	3,3 mg

### Anexo III – Ficha de prova

Nome: \_\_\_\_\_

Idade: \_\_\_\_\_

Código da amostra

Identifique o sabor:

Manga ☐      Meloa ☐      Limão ☐      Spearmint ☐

*Deixe o rebuçado dissolver-se naturalmente na boca e vá apreciando*

Sensação inicial      Agradável ☐      Indiferente ☐      Desagradável ☐

Existência de harmonia entre cor e sabor      Sim ☐      Não ☐

Deteção de sabor estranho      Sim ☐      Não ☐

Uniformidade do sabor ao longo da degustação      Sim ☐      Não ☐

Gosto residual      Agradável ☐      Indiferente ☐      Desagradável ☐

Avaliação global      Muito bom ☐      Bom ☐      Razoável ☐      Mau ☐      Muito mau ☐

Intenção de compra:

Compraria de certeza ☐      Provavelmente compraria ☐      Provavelmente não compraria ☐      Nunca compraria ☐

Sugestões e/ou comentários

--